

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HİPERGLİSEMİK KOŞULLARDA İNSAN UMBİLİKAL
KORD VENÖZ ENDOTEL HÜCRELERİNDE OTOFAJİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Kerem YANAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

Kerem YANAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPERGLİSEMİK KOŞULLARDA İNSAN UMBİLİKAL
KORD VENÖZ ENDOTEL HÜCRELERİNDE OTOFAJİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Kerem YANAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Kök Hücre Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08/07/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Çiler ÇELİK ÖZENÇİ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Nazlı Ece GÜNGÖR-ORDUERİ
Biruni Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Erol GÜRPINAR

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Kerem YANAR

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Emin Türkay KORGUN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana destek olup yol gösteren ve tez projemin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a,

Üzerimde en az danışman hocam kadar emeği bulunan Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN'a,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve birçok konuda fikir alışverişinde bulunduğum Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

İhtiyaç duyduğum her zaman bana yardımcı olan çok sevgili çalışma arkadaşlarıma (Emre ÇETİNDAG, Erhan CEBECİ, Gizem KORKMAZ, Türkan YANIK, Selin KISAR, Rıza Can ÇAKMAKCI, Ezgi AKAN, Mehmet DOĞAN ve Alexandra CERNOMORCENCO),

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

7 yaşımıdayken bana DNA ve genler ile alakalı bir kitap getirip benim bilime olan merakımı alevleyen babama,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, teyzeme, enişteme, anneanneme, dedeme ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Hiperglisemi, kanda aşırı miktarda glukoz bulunmasıyla karakterize bir durumdur. Damarların yapı taşı olan endotel hücreleri, hiperglisemiye karşı oldukça duyarlıdır. Otofaji, açlık ve stres koşullarında hücrenin hayatta kalma ve enerji metabolizmasını düzenleyen bir mekanizmadır. Bu çalışmada hiperglisemik koşullarda insan umbilikal kord venöz endotel hücrelerindeki (HUVEC) otofaji mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: İnsan umbilikal kord venöz endotel hücreleri, göbek kordonun venlerinden izole edildi ve farklı glukoz konsantrasyonlarına (5, 17, 25 mM Glukoz) sahip hücre besiyerlerinde 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminin sonunda hücreler Western Blot ve Real Time PCR analizleri için hazırlandı ve otofaji belirteçleri olan LC3, p62 ve Beklin-1, gen ve protein seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: 24 saat hiperglisemik gruptaki LC3 miktarı, kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldı. 48 saat hiperglisemik grupta LC3 miktarı, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı. 72 saat hiperglisemik gruptaki Beklin-1 ve LC3 miktarları, kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edildi. p62 protein miktarının ise 72 saat hiperglisemik grupta, kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi.

Sonuç: İlk 24 saatte hiperglisemiye bağlı olarak hücrelerde otofajinin azalması, glukoz aracılığıyla otofajinin inhibe olduğunu göstermektedir. Ancak 48 ve 72. saatlerde otofajide artış tespit edilmiştir. Otofaji artışının nedeni hiperglisemik ortama maruz kalma süresinin uzamasıdır. Sonuç olarak HUVEC hücrelerinde otofaji mekanizması zamana ve maruz kaldığı glukoz miktarına göre değişim göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: hiperglisemi, insan umbilikal kord venöz endotel hücreleri, otofaji

ABSTRACT

Objective: Hyperglycemia is a condition characterized by the presence of excessive amounts of glucose in the blood. Endothelial cells, which are the building blocks of vascular structures, are highly sensitive to hyperglycemia. Autophagy is a mechanism that regulates cell survival and energy metabolism under starvation and stress conditions. This study aims to investigate the autophagy mechanism in human umbilical cord venous endothelial cells (HUVEC) under hyperglycemic conditions.

Method: Human umbilical cord venous endothelial cells were isolated from the veins of the umbilical cord and incubated for 24 hours, 48 hours or 72 hours in special media with different glucose concentrations. At the end of these periods, the cells were prepared for Western Blot and PCR analysis and the autophagy markers LC3, p62 and Beclin-1 were compared between the groups.

Results: The amount of LC3 in the 24-hour hyperglycemic groups was significantly reduced compared to the control. The amount of LC3 increased significantly in the 48-hour hyperglycemic groups compared to the control. The amounts of Beclin-1 and LC3 in the 72 hour hyperglycemic groups increased significantly compared to the control. On the other hand, the amount of p62 decreased significantly in the 72-hour hyperglycemic groups compared to the control.

Conclusion: The decrease in autophagy in cells due to hyperglycemia in the first 24 hours indicates that autophagy is inhibited by glucose. However, an increase in autophagy was detected at 48 and 72 hours. The increase in autophagy is due to the prolonged exposure to the hyperglycemic environment. As a result, autophagy mechanism in HUVEC cells varies according to time and amount of glucose to which it is exposed.

Key words: hyperglycemia, human umbilical cord venous endothelial cells, autophagy

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç.....	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plasenta ve Göbek Kordonu	3
2.1.1 Plasenta Gelişimi	3
2.2. İnsan Umbilikal Kord Venöz Endotel Hücreleri (HUVEC)	7
2.3. Diabetes Mellitus Tipleri.....	8
2.4. Diyabetik Plasentada Oluşan Değişiklikler	10
2.5. Hiperglisemi ve Endotel Hücreleri.....	10
2.5. Otofaji nedir?.....	15
2.5.1. Otofaji mekanizması.....	16
2.5.2. Otofajinin Düzenlenmesi.....	18
2.5.3 p62	20
2.5.4 LC3.....	21
2.5.5. Beklin-1	22
2.6. Plasentada Otofaji.....	23

2.7. Endotel Hücrelerinde Otofaji	26
2.8. Hiperglisemik Koşullarda Endotel Hücrelerinde Otofaji	27
GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
3.1. Göbek Kordonu Eldesi ve HUVEC İzolasyonu	31
3.1.1 HUVEC Pasajlanması	31
3.2. In vitro Ortamda Hiperglisemik Koşulların Oluşturulması.....	32
3.3. SDS-PAGE Western Blot.....	32
3.4. Gerçek Zamanlı PCR.....	33
3.5. İstatistik	34
BULGULAR	35
4.1. Western Blot Bulguları.....	35
4.1.1. p62 Bulguları	35
4.1.2. Beklin-1 Bulguları.....	36
4.1.3. LC3 Bulguları.....	37
4.2. Gerçek Zamanlı PCR Bulguları	40
4.2.1. p62 Bulguları.....	40
4.2.2. Beklin-1 Bulguları.....	41
4.2.3. LC3 Bulguları.....	42
TARTIŞMA	43
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ.....	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Hücre ölümü tipleri	16
Tablo 3.1: Real-Time PCR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları ve baz büyüklükleri	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Embriyoda polar ve trofektoderm.	4
Şekil 2.2: Erken plasental gelişimin tipik aşamalarının şematik gösterimi.	6
Şekil 2.3: Endotel hücrelerinin fonksiyonları.	8
Şekil 2.4: AGE oluşumunun ana aşamaları	12
Şekil 2.5: AGE/RAGE bağlanmasından sonra AGE'lerin hücre içi etkileri.	13
Şekil 2.6: Hiperglisemiye yanıt olarak ROS-kaynaklı endotel disfonksiyonunun mekanizmaları.	15
Şekil 2.7: Memeli hücrelerinde otofagozom oluşumu ve regülasyonu.	18
Şekil 2.8: İlk trimesterde otofajinin regülasyonu.	24
Şekil 2.9: Termde otofajinin ROS tarafından kontrolü.	25
Şekil 2.10: Otofajinin inhibisyonu ve artan ROS miktarıyla inflamazomların oluşumu.	26
Şekil 2.11: Endotel hücrelerinde otofajinin önerilen rolleri.	27
Şekil 2.12: Diyabetes mellitusta mitokondriyal yaşam döngüsü ve dinamikleri	29
Şekil 4.1: p62 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.	35
Şekil 4.2: p62 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi.	36
Şekil 4.3: Beklin-1 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.	37
Şekil 4.4: Beklin-1 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi.	37
Şekil 4.5: LC3 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.	38
Şekil 4.6: LC3 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi.	38
Şekil 4.7: Otofaji belirteçlerinin glukoz konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak bütün gruplar arasında karşılaştırılması.	39
Şekil 4.8: p62 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi.	40

Şekil 4.9: Beklin-1 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi. 41

Şekil 4.10: LC3 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi. 42



SİMGELER ve KISALTMALAR

HUVEC	: İnsan Umbilikal Kord Venöz Endotel Hücreleri
T1DM	: Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
DM	: Diyabetes Mellitus
ATP	: Adenozin Trifosfat
KFERQ	: Lizin-Fenilalanin-Glutamat-Arjinin-Glutamin
HSP70	: Isı Şok Proteini 70 kDa
LC3	: Mikrotübül-iliskili Protein 1A/1B Hafif Zincir 3
MAP1A	: Mikrotübül-iliskili Protein 1A
MAP1B	: Mikrotübül-iliskili Protein 1B
P62	: Ubikitin-bağlayıcı Protein p62
NBR1	: BRCA1 Geninin Komşu Geni 1
NIX	: BCL2 ile Etkileşen Protein 3 Benzeri
BCL-2	: B-hücre Lenfoma-2
Kaspaz	: Sistein-aspartik Proteaz
BAK	: Bcl-2 Homolog Antagonist
BAX	: Bcl-2-iliskili X Proteini
BAD	: Bcl-2-iliskili Hücre Ölümünün Agonisti

ATG	: Otofaji-ilişkili
FIP200	: 200 kDa Fokal Adezyon Kinaz Ailesi ile Etkileşen Protein
PARP1	: Poli ADP-Riboz Polimeraz 1
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa B
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ULK1	: Unc-51 Benzeri Otofaji Aktive Edici Kinaz 1
ULK2	: Unc-51 Benzeri Otofaji Aktive Edici Kinaz 2
VPS15	: Fosfoinositit-3 Kinaz, Regülatör Alt Ünite 4
VPS34	: Fosfatidilinositol 3-kinaz Katalitik Alt Ünite Tip 3
AMBRA1	: Otofaji/Beklin-1 Regülatör 1
PE	: Fosfatidiletanolamin
PTDINS3P	: Fosfatidil İnositol-3 Fosfat
MTOR	: Memelilerde Rapamisinin Hedefi
MTOR1C	: Memelilerde Rapamisinin Hedefi Kompleksi-1
AMPK	: Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz
GATE16	: GABA Tip A Reseptör-ilişkili Protein Benzeri 2
GABARAP	: Gamma-aminobütirik Asit Reseptör-ilişkili Protein
LIR	: LC3-ilişkili Bölge
UBA	: Ubikitin-ilişkili Bölge

UVRAG	: Ultraviyole Radyasyon Direnç-ilişkili Protein
SH3GLB1	: Endofilin B1
ZFYVE	: Zinc-parmak FYVE Bölgesi
S6K	: Ribozomal Protein S6 Kinaz Beta-1
PKB	: Protein Kinaz B
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
Rubicon	: Rubicon-benzeri Otofaji Arttırıcı
3-MA	: 3-metiladenin
WIPI	: Fosfoinosititler ile Etkileşen WD-tekrarlı Protein
PB1	: Phox ve Bem 1 Domain
HeLa	: Henrietta Lacks/Servikal Kanser Hücre Hattı
UBD	: Ubikitin-bağlayıcı Bölge
ER	: Endoplazmik Retikulum
BH3	: Bcl-2 Homoloji Bölgesi 3
CCD	: Coiled-coil Bölgesi
ECD	: Evrimsel Olarak Korunmuş Bölge
BARA β-α	: Tekrarlı, Otofaji Spesifik Bölge
BCL-XL	: B-hücre Lenfoma-ekstra Büyük
JNK1	: c-Jun Terminal Kinaz 1
PGK-1	: Fosfogliserat Kinaz 1

DRAM	: DNA Hasarı ile Regüle Edilen Otofaji Modölatör Protein
APG9L2	: Anti-otofaji-ilişkili Protein 9B
DEPTOR	: DEP Bölgesi-içeren mTOR ile Etkileşen Protein
FGR	: Fetal Büyüme Geriliği
EVT	: Ekstravillöz Trofoblast
TSC1	: TüberoZ Skleroz 1
TSC2	: TüberoZ Skleroz 2
ROS	: Reaktif Oksijen Türevi
PRB	: Progesteron Reseptör-B
SASP	: Yaşlanma-ilişkili Sekretuar Fenotip
ASC	: Apoptoz-ilişkili Spek-benzeri Protein
IL	: İnterlökin
NLRP3	: NLR Ailesi Pirin Bölgesi İçeren 3
P/S	: Penisilin/Streptomisin
HBSS	: Hanks'in Dengeli Tuz Solüsyonu
FBS	: Fetal Sığır Serumı
TNS	: Tripsin Nötralize Edici Solüsyon
TBS-T	: Tris-tamponlu Salin/Tween-20
RNA	: Ribonükleik Asit
cDNA	: Komplement DNA

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TE	: Trofektoderm
İHK	: İç Hücre Kitlesi
FSG	: Fertilizasyon Sonrası Gün
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
vDKH	: Vasküler Düz Kas Hücresi
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GLUT	: Glukoz Taşıyıcı
AGE	: Gelişmiş Glikasyon Ürünü
AGER1	: Gelişmiş Glikasyon Ürünü Reseptör 1
AGER3	: Gelişmiş Glikasyon Ürünü Reseptör 3
RAGE	: AGE İçin Reseptör
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Proteini 1
NO	: Nitrik Oksit
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
ICAM-1	: İntrasellüler Adezyon Proteini 1
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
RhoA	: Transforme Edici Protein Ras Homolog Aile Üyesi A
ROCK	: Rho-ilşkili Protein Kinaz
CDC42	: Hücre Bölünme Kontrol Proteini 42 Homolog



GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Hiperglisemi, kanda aşırı miktarda glukoz bulunması durumudur. Hiperglisemiye genel olarak dolaşımdaki insülin seviyesinin düşmesi ya da hücrelerde insülin direncinin gelişmesi sonunda gelişen hücredeki glukoz metabolizmasının bozulması neden olmaktadır. Endotel hücreleri hiperglisemiye karşı oldukça duyarlıdır. Glukoz-indüklü endotelial disfonksiyon, diyabetik vasküler komplikasyonlara neden olmakta ve glisemik kontrolün bozulması sonucunda kardiyovasküler komplikasyonlara karşı yeterli kompensasyon sağlanamamaktır (Gero, 2018). Hiperglisemik koşullar sonucu endotel fonksiyonunun bozulması, diyabette gerçekleşen vasküler hastalıkların temelini oluşturmaktadır (Hadi ve Suwaidi, 2007). Otofaji, açlık ve stres koşullarında hücrenin hayatta kalma ve enerji metabolizmasını düzenleyen bir mekanizmadır (Mizushima, 2007). Programlı bir şekilde ilerlemesi ile apoptoza benzerken; rol alan moleküler kompleksler farklıdır ve süreç boyunca ATP harcanmaması özelliğiyle apoptozdan ayrılır. Temel bir intrasellüler sindirim ve geri dönüşüm yolu olan otofaji, hücrel homeostazinin korunmasında ve normal gelişim sırasında yeniden modellemede hayati öneme sahiptir. Otofaji mekanizmasındaki anormallikler kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi birçok patoloji ile ilişkilidir (Levine ve Kroemer, 2008). Hiperglisemik koşullarda (Tip I Diyabet ve Tip II Diyabet) otofajinin arttığı ve böylece hücrelerin diyabetik hasara karşı korunduğu düşünülmektedir (Meijer ve Codogno, 2007). Fakat otofajinin hücreler üzerindeki etkisi hücreden hücreye değişmektedir. Bu projede, farklı glukoz konsantrasyonlarında inkübe edilen insan umbilikal kord venöz endotel hücrelerinde (HUVEC), önemli otofaji belirteçleri olan p62, LC3 ve Beklin-1 seviyeleri karşılaştırılarak bu hücrelerde hiperglisemiye bağlı olarak otofajinin nasıl etkilendiği araştırılacaktır.

Çalışmanın önemini aşağıdaki maddeler ile açıklayabiliriz.

Hiperglisemik koşulların endotel hücrelerinde gerçekleşen otofaji mekanizmasına etkisini belirlemek.

2- Hiperglisemiye bağlı olarak gebelik esnasında ortaya çıkan Gestasyonel diyabet, ya da Tip I ve Tip II diyabet koşullarında endotel hücrelerinde gerçekleşen, endotel disfonksiyonun da otofaji mekanizmasını etkisini açıklamaya çalışmaktır.

Bu projenin hipotezi; “HUVEC’lerdeki otofaji mekanizması hiperglisemik koşullarda zamana ve glukoz miktarına bağlı olarak etkilenir” olarak kurulmuştur. Bu hipotezi test etmek için normal ve hiperglisemik koşullarda inkübe edilmiş HUVEC’lerdeki otofaji ile ilişkili proteinlerden p62, LC3 ve Beklin-1 değişimleri Western Blot ve gerçek zamanlı PCR analizleriyle tespit edilerek iki grup arasındaki protein ve gen düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızın amacı; hiperglisemik koşullarda HUVEC’lerin otofaji mekanizmasında, zaman ve glukoz miktarına bağlı olarak ne gibi değişikler olduğunu belirlemektir.

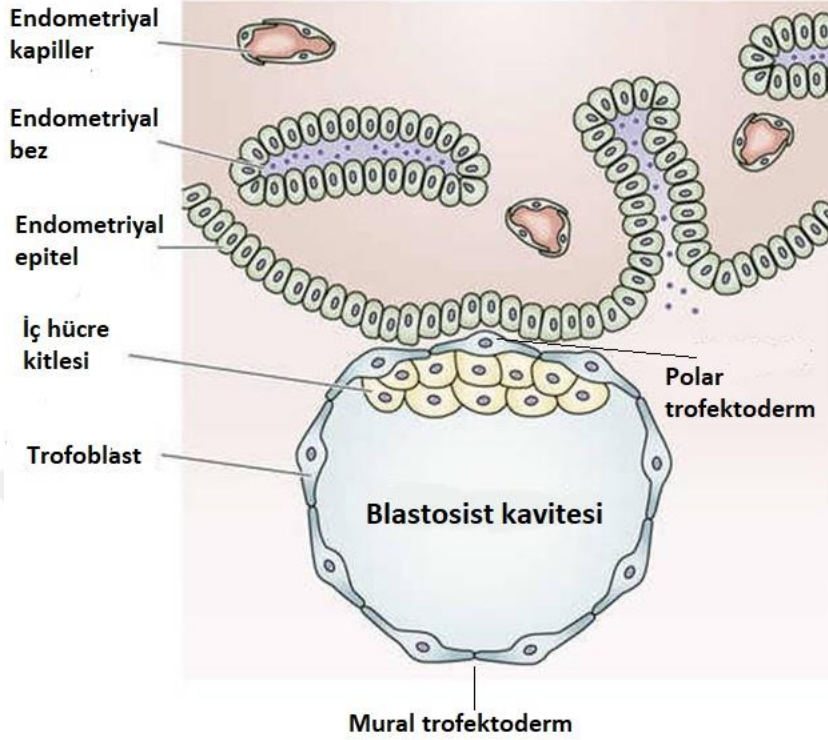
GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta ve Göbek Kordonu

Plasenta fetüsün besin ve oksijen ihtiyacını karşılayan, termoregülasyonu sağlayan ve fetüs kaynaklı atıkların atılımını gerçekleştiren fetomaternal bir organdır. Gebelik hormonlarını üreterek gebeliğe yardımcı olmaktadır. Plasentanın fetüsle ilgili işlevlerini yerine getirebilmesi için vaskülogenez ile plasenta içerisinde yeni damarların oluşumu ve oluşan bu damarların anjiyogenez ile dallanması oldukça önemlidir. Plasenta ile fetüs arasındaki bağlantıyı sağlayan göbek kordonu, içinde barındırdığı iki arter ve bir ven yapılarıyla anne ile fetüs arasındaki besin ve oksijen iletimini sağlamaktadır.

2.1.1 Plasenta Gelişimi

İnsan plasentası, fertilizasyondan 5 gün sonra (Fertilizasyon sonrası gün-FSG) oluşan implantasyon öncesi embriyonun dış tabakası olan trofektodermden (TE) gelişir. Bu aşamada, implantasyon öncesi embriyo blastosist olarak adlandırılıp iki tip hücre içerir: iç hücre kitlesi (İHK) ve TE. TE ikiye ayrılmaktadır. Blastosiste İHK ile komşu olan trofoektoderm, polar TE olarak isimlendirilip uterus mukozasının yüzey epiteline invaze olur. Blastosiste implantasyonun gerçekleştiği kutbun karşısında bulunan trofoektoderm de mural trofoektoderm olarak isimlendirilir (Şekil 2.1).

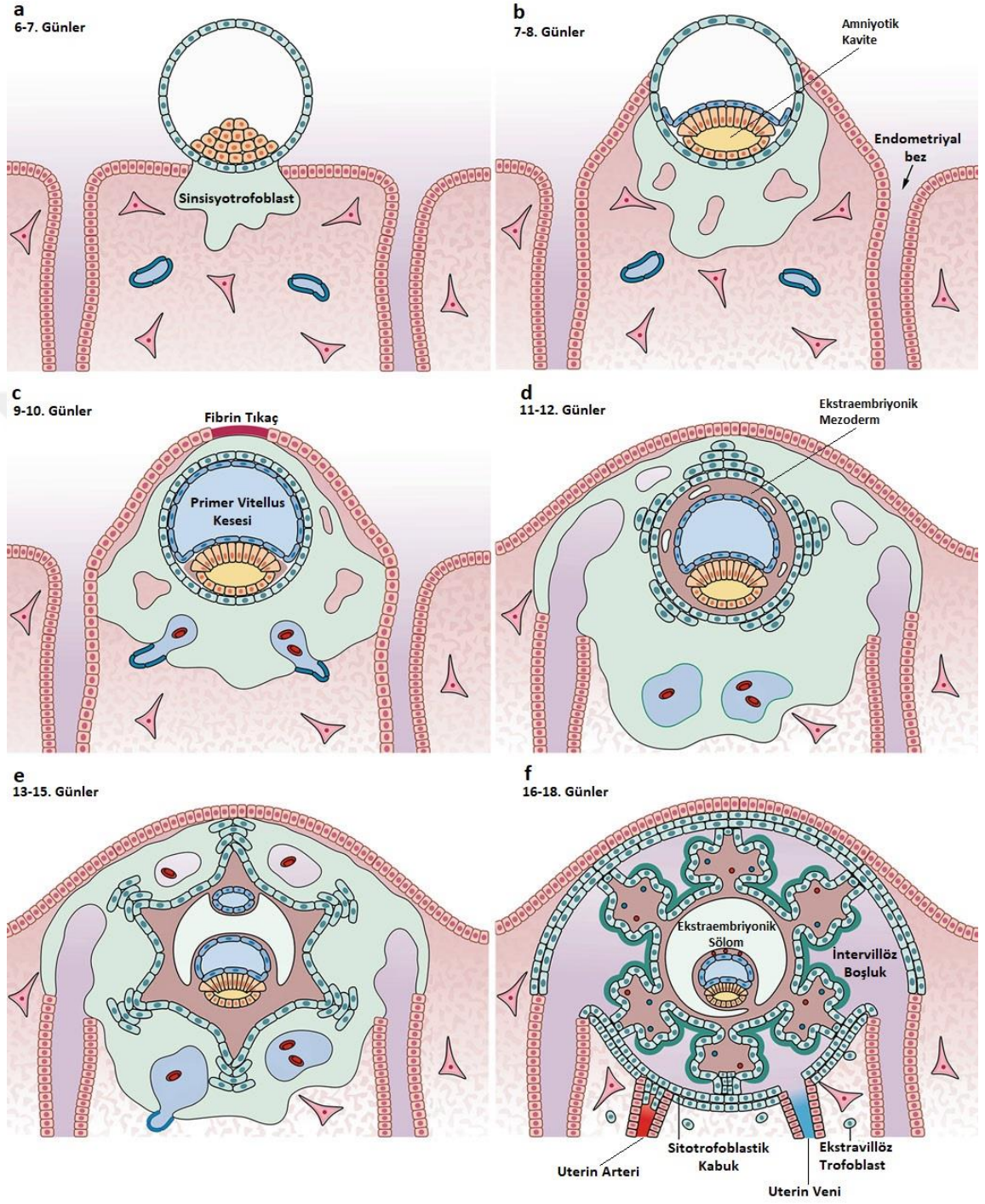


Şekil 2.1: Embriyoda polar ve trofektoderm. Embriyo implantasyonu, iç hücre kitlesine komşu olan polar trofektodermden gerçekleşir. Polar trofektodermın tam zıt kutbuna karşılık gelen kısım ise mural trofektoderm olarak adlandırılır (Walter Boron, 2016).

İmplantasyonun en erken aşamaları insanlarda görselleştirilmemiş olsa da erken gebelik günlerindeki morfoloji histerektomi örnekleri ve yüksek primatlardaki morfolojik gözlemler ile tespit edilmiştir. Fertilizasyon sonrası 6-7 günde blastosist uterus yüzey epiteline bağlanmanın ardından TE'nin primer sinsisyum oluşturmak üzere füzyona uğradığı belirlenmiştir (Şekil 2.2 a). Fertilizasyon sonrası 7-8. günlerde ise plasental gelişime bağlı olarak prelaküenal evreye ulaşılır (Boyd, 1970) (Şekil 2.2 b).

İmplantasyonun ardından, primer sinsisyum, gebelik sırasında desidua olarak bilinen özel bir dokuya dönüşen yüzey epitelinden, endometriyuma doğru hızla yayılır (Şekil 2.2 c,d) (Schlafke ve Enders, 1975). Yaklaşık FSG 11-12'e gelindiğinde, blastosist tamamen desidua içine gömülüdür ve yüzey epiteliyle kaplıdır (Şekil 2.2 d) (Hertig ve ark., 1956). Sıvı dolu boşluklar (lakünalar) daha sonra genişleyen ve birleşen sinsisyal kütle içinde görünür ve onu bir trabekül sistemine böler. Bu laküner aşamadır. Sinsisyum ayrıca desidual bezleri de aşındırır ve sekresyonların sinsisyal kütleyle ulaşmasına izin verir (Şekil 2.2 b,c,d) (Hertig ve ark., 1956).

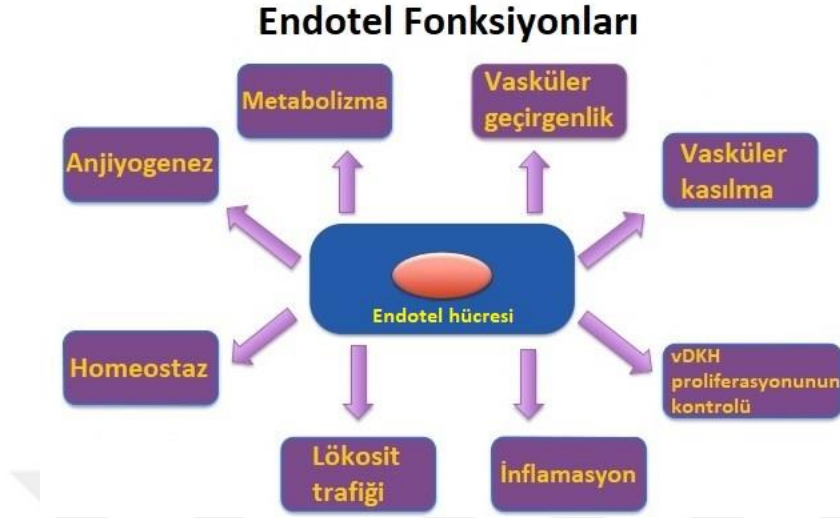
Sinsisyumun altındaki trofoblast hücreleri (sitotrofoblast hücreleri olarak adlandırılır) başlangıçta desidua ile doğrudan temas halinde değildir. Ancak sitotrofoblastlar, primer villus oluşturmak için hızla proliferer olarak primer sinsisyumdan çıkıntılar oluştururlar; bu aşama, gelişimin villöz aşamasıdır (Şekil 2.2 d,e). Primer villüslerin daha fazla dallanması ile villöz ağaç yapıları oluşur ve laküna, intervillöz boşluk haline gelir. Sitotrofoblast hücreleri daha sonra primer sinsisyumu geçerek, villus ile desidua arasında bir sitotrofoblast kabuk oluşturur (Şekil 2.2 f). Ekstraembriyonik mezenkimal hücrelerin sinsisyal ve sitotrofoblast hücrelerine katılmasıyla birlikte sekonder villus oluşur. Fertilizasyon sonrası 16-18. gün civarında sekonder villüslerin mezenkimal kısmında fetal kılcal damarların oluşmasıyla birlikte tersiyer villusların gelişimini başlar (Şekil 2.2 f). Villöz ağaçlar, koryonik plakdan kademeli olarak dallanarak hızla büyümeye devam eder. Sitotrofoblast kabuğunun desidua ile temas halinde olduğu yerlerde, sitotrofoblast hücreleri, epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) çok benzeyen bir süreç ile ekstravillöz trofoblast (EVT) hücrelerine farklılaşır ve desiduya invaze olur (Turco ve Moffett, 2019).



Şekil 2.2: Erken plasental gelişimin tipik aşamalarının şematik gösterimi. (a, b) Prelakunar evreler. (c) Laküner evre. (d) Laküner evreden primer villöz evreye geçiş. (e) Sekonder villöz evre. (f) Tersiyer villöz evre (Baergen, 2012).

2.2. İnsan Umbilikal Kord Venöz Endotel Hücreleri (HUVEC)

Endotel hücreleri yassı şekilli, nükleusları merkezi olarak yerleşmiş hücrelerdir. Epitelyal karakterde hücreler olmasına rağmen, embriyo gelişiminin erken aşamalarında epiblastın oluşturduğu mesoderm tabakasından köken alırlar (Huber ve ark., 1998; Marom ve ark., 2005). Endotel hücreleri kan damarlarının ve lenfatik damarların iç kısmını saran, tek katlı skuamöz yapıda olan endotelyum tabakasını oluşturur. Endotel hücrelerinin oluşturduğu kan damarları, distal organlara besin ve oksijen taşınımını gerçekleştirerek homeostazı sağlar (Jain, 2003; Aird, 2005, 2012). Endotel hücreleri arasında adherent bağlantılar bulunmaktadır. Bu bağlantılar sayesinde damardan dokuya madde geçişini düzenlerler (Claesson-Welsh, 2015). Endotel hücreleri normalde sessiz durumdadır, ancak inflamasyona karşı dinamik yanıt oluşturabilirler ve dolayısıyla lökosit trafiğini düzenlerler (Vestweber, 2015; Li, Fang, ve ark., 2016). Endotel hücreleri anjiyogenik özelliklere sahiptir, pro-anjiyogenik sinyal varlığında sessiz durumdan aktif duruma geçerek damarların dallanmasını sağlarlar (Lamallice ve ark., 2007). Bunun yanı sıra endotel hücreleri nitrik oksit ve prostasiklin gibi vazodilatör ya da tromboksan ve endotelin-1 gibi vazokonstriktör faktör salınımı gerçekleştirirler ve vasküler kasılmayı düzenlerler (Sandoz ve ark., 2010). Damar hasarında endotel hücreleri, vasküler düz kas hücrelerini (vDKH) uyararak Smad-bağımlı bir mekanizma ile vDKH'lerin proliferasyonunu sağlarlar (Milliat ve ark., 2006; Jacot ve Wong, 2008). Endotel hücrelerinin fonksiyonları Şekil 2.3'de özetlenmiştir (Şekil 2.3). Endotel hücrelerinin fonksiyonlarını düzgün olarak gerçekleştirmesi vasküler homeostaz için kritiktir, dolayısıyla endotel hücre disfonksiyonlarını ateroskleroz (Horio ve ark., 2014; Gimbrone ve Garcia-Cardena, 2016), nörodejenerasyon (Koizumi ve ark., 2016) ve kanser (Franses ve ark., 2013) gibi pek çok hastalık ile ilişkilendirmek normaldir.



Şekil 2.3: Endotel hücrelerinin fonksiyonları.

HUVEC hücreleri ilk defa 1970’li yıllarda Jaffe ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve hücre kültürü yapılmıştır (Jaffe, Hoyer, ve ark., 1973; Jaffe, Nachman, ve ark., 1973; Jaffe ve ark., 1974). İnsan umbilikal kord venöz endotel hücreleri (HUVEC), insan endotel hücre patolojisi ve fonksiyonu bakımından *in vitro* ortamda çalışılmaktadır (H. J. Park ve ark., 2006). HUVEC’lerin izole edilmesi nispeten kolaydır. Ayrıca göbek kordonu doğumdan sonra atılan biyolojik bir atık olduğundan bulunması zor bir materyal değildir. Bunun yanı sıra, umbilikal kordun ven lümeni kolayca kanüle edilebilecek kadar geniştir ve endotel hücreleri enzimatik sindirim ile kolayca izole edilebilir (Kocherova ve ark., 2019). 2017’da yapılan bir araştırmaya göre, endotel hücreleri arasında en çok yayın yapılan hücre türü de HUVEC’lerdir (Hauser ve ark., 2017). Ayrıca aynı çalışmada standart hücre kültür koşullarında HUVEC’lerin, diğer endotel hücrelerine kıyasla daha fazla çoğaldığı belirtilmiştir (Hauser ve ark., 2017). Tüm bu özellikler HUVEC’leri uygun bir çalışma modeli yapmaktadır.

2.3. Diabetes Mellitus Tipleri

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) bir anabolik hormon olan insülinin tam veya kısmi yokluğu sonucu oluşan kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücreleri tarafından sentez edilir. Bu hücrelerin yokluğu veya otoimmün nedenlerle hasara uğraması, T1DM ile sonuçlanır. Tedavisinde mutlaka insülinin dışarıdan verilmesi gerektiğinden insüline bağımlı diabetes mellitus olarak da adlandırılır. T1DM’in görülme sıklığı bütün diyabetikler arasında %10 civarındadır ve

daha çok çocuklarda görülür (Norris, 2005). Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) ya da insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus insülinin periferik etkisinde ve pankreas β hücrelerinin fonksiyonunda bozukluklarla seyreden bir endokrin hastalıktır. Toplumda en sık görülen diabetes mellitus tipidir. T2DM'ta en önemli özellik, insülinin fizyolojik etkilerine karşı periferik dokularda, özellikle de çizgili kaslarda direnç oluşumudur. Bu direnç, insülin reseptörleri veya post insülin reseptör defektlerine bağlı olabilir. İnsülin direncini oluşturabilen veya arttırabilen birçok faktör vardır. Bunlardan bazıları arasında obezite, hipertansiyon, yüksek kolesterol, metabolik sendrom, stres ve akromegali sayılabilir (Kahn, 2000; Lovejoy, 2002).

Gebelik sırasında fark edilen diyabet, gestasyonel diabetes mellitus (GDM) olarak adlandırılır. Gebelikteki diyabetlilerin %90'ını GDM'liler oluşturur. Her ne kadar GDM doğumdan sonra kaybolursa da GDM'li kadınların %30'u 7-10 yıl içinde diyabet veya bozulmuş glukoz intoleransı tanısı alır (Coustan, 2013). GDM'nin sonraki gebeliklerde tekrar görülme oranı ilk trimesterdeki kiloya bağlı olarak %60-90 arasındadır (Moses, 1996). GDM'li gebelikler, maternal ve fetal komplikasyonlar açısından yüksek riskli gebelikler grubuna girmektedir (Casey ve ark., 1997). GDM'de erken doğum, perinatal mortalite, fetal makrozomi, polisitemi, sarılık, hidroamniyoz, kardiomyopati, ilk trimesterde hipoglisemi ve gebeliğin ikinci yarısında hiperglisemi riski artmaktadır. GDM'li annenin bebeği, erken yaşlarda obezite gelişimi, bozulmuş glukoz intoleransı ve diyabet riski altındadır (Silverman ve ark., 1991).

Diyabet tanılı gebelikler hem anne hem de fetüs açısından riskli gebeliklerdir. Diyabetin gebeliğe olumsuz yönde etkilerinden bazıları; fetüste makrozomi, spontan abortus, konjenital malformasyonlar, ölü doğum, polihidramniyoz ve annede hipertansiyon, ketoasidoz, retinopati, nöropati, nefropati ve preeklampsi risklerinin artmasıdır (Plows ve ark., 2018). Glukoz plasentadan kolaylıkla geçerek fetüse ulaşır ve fetüs hiperglisemiye Langerhans adacıklarının hiperplazisiyle ve artan insülin salgısıyla yanıt verir. Bu da maternal diyabette fetüste fazla kilo görülmesinin başlıca sebebidir. Fetal makrozomi, organların hem hücre sayısındaki artıştan hem de hücrelerin boyut olarak büyümesinden kaynaklanmaktadır. Diyabetik anne fetüslerindeki hiperglisemi,

maternal substrat artışı ve fetal hiperinsülinemi gibi multifaktöriyel etkilerle fetal makrozomi ortaya çıkar (Desoye ve ark., 2002).

2.4. Diyabetik Plasentada Oluşan Değişiklikler

DM'li gebelerin plasentalarında en sık gözlenen anormallik villöz immatüritesidir. Villöz immatüritesi, gebelik yaşına göre terminal villusların sayısında azalma ve matür, immatür intermediyet villusların sayısında artma ile karakterizedir. Diyabetik gebeliklerin %40'ında plasentada maturasyon gebelik haftasına uygun iken %60 plasentada immatürite vardır. Villöz immatüritesinin fetoplasental vasküler gelişim sorununun bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir (Charnock-Jones ve ark., 2004). Diyabetik plasentalarda plasentamegali gözlenir. Plasentamegali, yüksek DNA içeriğiyle kanıtlanan parankimal doku hücreleri artışına bağlı olarak gelişmektedir. Villusları oluşturan hücrelerin neredeyse tamamında artış görülür. Villöz hücre proliferasyonunda artışa bağlı olarak villus çaplarında artış gözlenir. Sitotrofoblastların, sinsisyotrofoblasta farklılaşmasını uyaran epidermal büyüme faktörünün reseptörünün ekspresyonu DM hastalarında azalmıştır. Bu nedenle, villöz sitotrofoblastlar farklılaşmaktan ziyade proliferasyon gösteriyor olabilir (Cervar ve ark., 1996). DM'li plasentalarda bozulan plasental perfüzyonun, trofoblastik bazal membran kalınlaşmasından ve değişen umbilikal endotel yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diyabetik plasentalarda koranjyozis sıklıkla görülür. Koranjyozisin, oluşan hipoksiyi kompanse etmek amacıyla anjiyogenik faktörlerin sentezinin uyarılmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Diyabetik plasentalar fetal pletor (kan toplanması) yüzünden koyu renklidir.

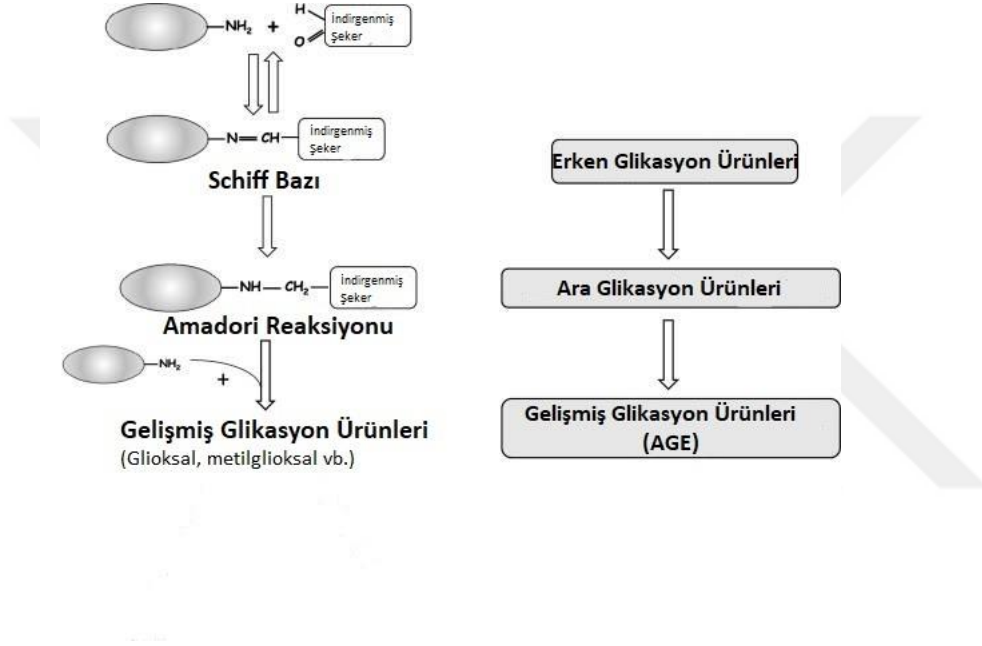
2.5. Hiperglisemi ve Endotel Hücreleri

Hipergliseminin endotel hücreleri üzerindeki etkisi, inflamasyon ile benzerlik gösterir. Hiperglisemik hücre kültür besiyerlerinde inkübe edilen endotel hücreleriyle yapılan çalışmalarda, kontrole kıyasla daha düşük nitrik oksit üretimi (Ding ve ark., 2000; Du ve ark., 2001), NF-κB aktivasyonunun artması (Hamuro ve ark., 2002; Piga ve ark., 2007), pro-inflamatuvar gen ekspresyonlarının artması (Morigi ve ark., 1998; Manduteanu ve ark., 1999; Esposito ve ark., 2001; Piconi ve ark., 2004) ve ortama lökosit kemotaksisinde artış (J. A. Kim ve ark., 1994; Manduteanu ve ark., 1999; Esposito ve ark., 2001) gözlenmiştir. Hiperglisemi endotel hücrelerinde ROS oluşumunu da direkt glukoz otooksidasyonu (Wolff ve ark., 1991), mitokondriyal süperoksit üretimi (Eriksson ve

Borg, 1993) ve eNOS ayrılması (Cai ve ark., 2005) gibi yollar ile uyarmaktadır. Glikoliz sırasında gerçekleşen glukoz oksidasyonu sonucunda ROS üretilir ve ROS miktarı normalde hücrenin antioksidan defans mekanizmaları (süperoksit dismutaz, tiyoredoksin, glutatyon peroksidaz ve katalaz) ile kontrol edilmektedir (Gelain ve ark., 2009). Ancak bu sistemler hiperglisemik koşullarda aşırı yüklenir. Birçok hücre hiperglisemiye yanıt olarak GLUT ekspresyonunu azaltarak aşırı oksidasyonu ve ROS üretimini engeller, ancak endotel hücrelerinde GLUT ekspresyonu, intrasellüler glukoz seviyesinin yükselerek ortam ile eşitlenmesi için devam eder (Mandarino ve ark., 1994). Glikolitik oksidasyonun artması ve mitokondriyel elektron taşıma sistemindeki bozukluklar, son elektron alıcısı olan oksijene elektron taşınmasını engelleyerek oksidatif stresi uyarır. Aşırı ROS üretimine bağlı olarak eNOS ayrılması gerçekleşir ve bu olay da hiperglisemik koşullarda oluşan oksidatif stresi artırır (Zou ve ark., 2002). Birçok çalışmada ROS üretiminin engellenmesi ya da antioksidan defans mekanizmalarının uyarılmasının, hipergliseminin endotel hücreleri üzerindeki disfonksiyonel etkileri azalttığı bildirilmiştir. Mitokondriyel süperoksit üretiminin engellenmesi sonucunda hiperglisemi ile indüklenen ROS üretiminin de engellendiği gösterilmiştir (Nishikawa ve ark., 2000). Yapılan başka bir çalışmada, bir antioksidan olan N-asetil-L-sistein, hiperglisemi ilişkili endotel apoptozunu engellemiştir (Recchioni ve ark., 2002). Yine başka bir antioksidan olan koenzim Q10 ise yüksek glukoz ile indüklenen pro-inflamatuvar gen ekspresyonunu ve monosit bağlanmasını engellemiştir (Tsuneki ve ark., 2007). Hücre kültürü modellerine ek olarak diyabette ve gestasyonel diyabette endotel hücrelerinde oksidatif stresin arttığı, hayvan modellerinde de gösterilmiştir (Tsao ve ark., 1998; Yang ve ark., 2008). Bütün bu bilgiler, hipergliseminin endotel hücrelerinde aşırı ROS üretimini indükleyerek endotel disfonksiyonuna neden olduğunu göstermektedir.

Diyabet-aracılı endotel hücre fonksiyonuna neden olan bir başka mekanizma da hiperglisemi-ilişkili gelişmiş glikasyon ürünleridir (AGE). Glikasyon, karbonhidrat parçalarının bir proteine enzimatik yollar kullanılmadan eklenmesidir. Birkaç reaksiyon sonunda, geri dönüşümsüz AGE'ler oluşmaktadır. Glikasyonun ilk aşamasında indirgenmiş bir şeker (glukoz ya da fruktoz), proteinlere bağlanır ve bir Schiff bazı oluşur (Slavina ve ark., 1987). Oluşan Schiff bazı daha sonra ketoaminleri oluşturur. Ketoaminler ise oksidatif ya da oksidatif olmayan yolak ile geri dönüşümsüz AGE modifikasyonlarını

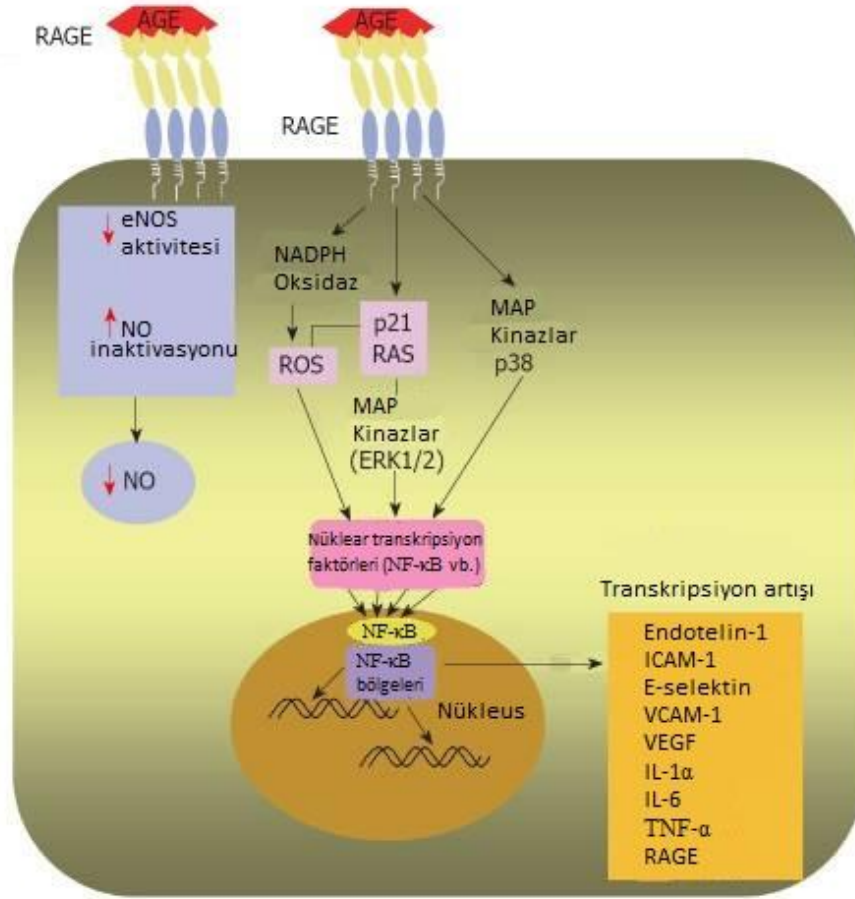
oluşturur (Şekil 2.4) (John ve ark., 1993; Singh ve ark., 2001). Bu modifikasyonlardan en yaygın olanlar glioksal ve metilglioksaldır (Thornalley, 1990; K. J. Wells-Knecht, Zyzak, ve ark., 1995; M. C. Wells-Knecht, Thorpe, ve ark., 1995). AGE oluşumu, doğal olarak hücrelerde gerçekleşen ve endojen negatif regülatörler ile kontrol edilen bir süreçtir, ancak hiperglisemide serum ve damar duvarındaki proteinler aşırı glikasyona uğradığından, AGE oluşumu normalin üzerine çıkar (Thornalley, 1990).



Şekil 2.4: AGE oluşumunun ana aşamaları (Stinghen ve ark., 2016).

AGE'ler, hem reseptör-bağımlı hem reseptör-bağımsız yollarla hastalıkları şiddetlendirebilirler. AGE'ler, "AGE için reseptör" (RAGE) (Neeper ve ark., 1992), AGE reseptörü 1 (AGER1), AGER3 ve CD36 (Karasu, 2010) dâhil olmak üzere birçok hücre yüzey reseptörüne bağlanır. İmmünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan RAGE, AGE ile ilişkili endotel hücre fonksiyonlarını ve aktivasyonunu düzenler. RAGE reseptör sinyalizasyonu iyi anlaşılmasa da RAGE'nin ligasyonunun, endotel ROS üretimini arttırdığı bilinmektedir (Yan ve ark., 1994). Endotel hücrelerinde AGE'ye bağlı pro-inflamatuar gen ekspresyonu (VCAM-1, E-selektin) da benzer şekilde RAGE reseptörünün ligasyonu ile gerçekleşmektedir (Schmidt ve ark., 1995). AGE'ler, endotel hücrelerinde eNOS ekspresyonunu ve L-sitrülin üretimini azaltmakla beraber (B. Xu ve ark., 2005), ROS-aracılı NO üretimi de azaltırlar. Bunun yanı sıra AGE'ler, eNOS'ta

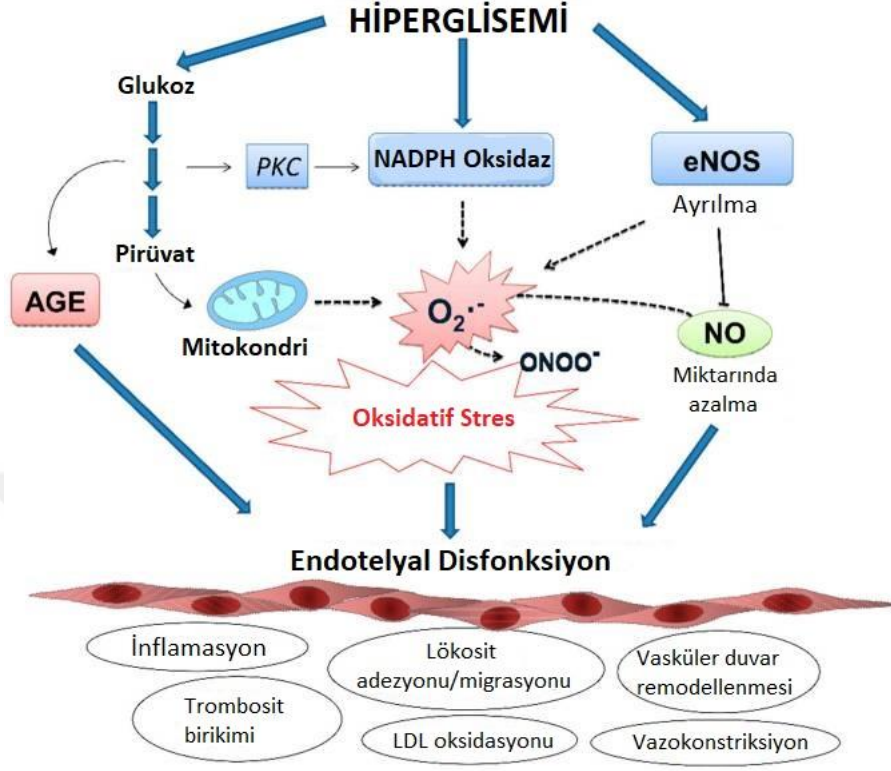
bulunan serin rezidülerinin fosforilasyonunu azaltarak, endotel hücrelerinde histamin kaynaklı NO üretimini de inhibe eder (B. Xu ve ark., 2003) AGE-RAGE etkileşiminin endotel hücreleri üzerindeki etkisi Şekil 2.5'te özetlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: AGE/RAGE bağlanmasından sonra AGE'lerin hücre içi etkileri. Bir endotel hücrenin yüzeyindeki AGE/RAGE etkileşimi, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazı aktive eder ve ROS üretimini artırır ve p21 RAS ve MAPK'ları fosforile eder. Ayrıca, AGE/RAGE etkileşimi, p38 MAPK aktivasyonu yoluyla sinyalizasyonu indükler. AGE/RAGE sinyalizasyonundaki ana adım, NF-κB'nin aktivasyonu ve nükleusa translokasyonudur. Transloke olduktan sonra endotelin-1, ICAM-1, E-selektin gibi hedef genlerin transkripsiyonunu artırır. Bu nedenle, AGE/RAGE bağlanması inflamatuvar bir kaskadı tetikler. AGE, eNOS aktivitesini azaltarak ve NO'yu inaktive ederek NO miktarını azaltır (Hegab ve ark., 2012).

AGE'lerin reseptörden bağımsız etkileri arasında hücre dışı matriks modifikasyonu (Sell ve Monnier, 1989), NO üretimini azaltma (Bucala ve ark., 1991) LDL'nin (Bucala ve Vlassara, 1995) glikasyonu yer alır. AGE oluşumu geri dönüşümsüz olduğundan, hiperglisemi hücre dışı matriks proteinlerinin glikasyonunu uyararak tip I kollajen ve elastinin çapraz bağlanmasını sağlayarak, damar sertleşmesine neden olur (Corman ve

ark., 1998; Tanaka ve ark., 2000; Goldin ve ark., 2006). Damar sertleşmesi sistemik hipertansiyona katkıda bulunur ve damar duvarındaki gerilimi artırır (Diez, 2007). Buna ek olarak, subendotelyal matriks proteinleri olan laminin ve kollajen IV'ün glikasyonu, matriks bütünlüğünü bozar ve endotel hücre yapışmasını ve yayılmasını önler (Charonis ve ark., 1990; Haitoglou ve ark., 1992; Goldin ve ark., 2006). Bu nedenle, bazal membran etkileşiminin bozulması, endotel hücre kaybının artmasına neden olur. Matriks modifikasyonlarına ek olarak, hücre içi sinyal proteinlerinin metilglioksal tarafından glikasyonu, endotelyal hücre stres yanıtını (JNK, p38) aktive eder (Yamawaki ve ark., 2008). Bununla birlikte metilglioksal, NF- κ B aktivasyonunu da inhibe eder (Laga ve ark., 2007) ve NF- κ B aktivasyonu gerçekleşmediğinde JNK sinyalizasyonu apoptozu uyarır (G. Tang ve ark., 2001). Bununla tutarlı olarak, metilglioksal, kullandığı sinyal mekanizmaları tam anlaşılmamış olsa da endotel hücre apoptozunu uyarır (Chan ve Wu, 2008). Son olarak, glikasyon ile modifiye edilmiş LDL de tıpkı AGE'ler gibi RAGE reseptörüne bağlanabilir ve dolayısıyla ROS üretiminin artarak pro-inflamatuvar gen ekspresyonunun indüklenmesini sağlar (Ma ve ark., 2006; Dong ve ark., 2009; Toma ve ark., 2009; Sangle ve ark., 2010). Hipergliseminin endotel hücre disfonksiyonuna olan etkileri Şekil 2.6'da özetlenmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Hiperglisemiye yanıt olarak ROS-kaynaklı endotel disfonksiyonunun mekanizmaları. Glukoz seviyelerinin artmasının neden olduğu vasküler hasar, esas olarak endotelde ROS üretimi ile NO biyoyararlanımı arasındaki bir dengesizlikten ve AGE birikiminin neden olduğu doğrudan hasardan kaynaklanır. Ortaya çıkan endotelial disfonksiyon, proinflatuvar yanıt oluşumu, lökositlerin kemotaksisi, oksitlenmiş LDL partiküllerinin birikmesi ve bozulmuş vazodilatasyon dahil olmak üzere çeşitli zararlı mekanizmaların aktivasyonu ile karakterize edilir (Burgos-Moron ve ark., 2019).

2.5. Otofaji nedir?

Otofaji, sitoplazmik elemanların otofagozomlar içerisine alınıp degrade olmaları için lizozoma aktarıldıkları evrimsel olarak korunmuş bir hücresel süreçtir. Programlı bir şekilde ilerlemesi ile apoptoza benzerken; rol alan moleküler kompleksler farklıdır ve süreç boyunca ATP harcanmaması özelliğiyle apoptozdan ayrılır (Tablo 2.1). Temel bir intrasellüler sindirim ve geri dönüşüm yolu olarak otofaji, hücresel homeostazinin korunmasında ve normal gelişim sırasında yeniden modellemede hayati öneme sahiptir. Otofaji mekanizmasındaki disfonksiyon kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi birçok patoloji ile ilişkilidir (Levine ve Kroemer, 2008).

Katabolik ve dejeneratif bir süreç olan otofaji 3 farklı formda bulunur: çözünabilir sitozolik bileşenlerin lizozomal membranın invajinasyon ile lizozom içine alınımını içeren

mikrotofaji, KFERQ peptid motifini taşıyan spesifik proteinlerin Hsp70 şaperon proteini ile lizozoma transloke edilerek degrade edildiği **şaperon-aracılı otofaji** (LC3, p62 ve NBR1 gibi adaptörler ya da NIX gibi otofaji reseptörleriyle etkileşerek seçilimi sağlar), ve otofajik kargoyu içeren çift zarlı otofagozomun oluşumunu ve lizozomla birleşimini içeren **makrotofaji** (Sridhar ve ark., 2012). Otofajinin türünden bağımsız olarak otofajik kargo lizozomal asit hidrolazlar ve katepsinler ile degrade olur ve sitoplazmaya salınırlar ve farklı anabolik yollarda yapıtaş olarak yeniden kullanılırlar (Inpanathan ve Botelho, 2019; Khandia ve ark., 2019). Otofaji hipoksi, besin eksikliği, metabolik, oksidatif ve proteotoksik stres gibi stres koşulları ile upregüle olur (Daskalaki ve ark., 2018).

Tablo 2.1: Hücre ölümü tipleri

Hücre Ölümü Tipi	Programlı	Programlı	Programlı	Programsız
<i>Terminoloji</i>	<u>Apoptoz</u>	<u>Otofaji</u>	<u>Entosis</u>	Nekroz
<i>İlerleyiş</i>	<u>Kaspaz Sistemi</u>	<u>İki ubiquitin benzeri konjugasyon sistemi</u>	<u>Lizozom-aracılı, kaspaz-3 bağımsız yolak</u>	<u>İmmün sistem aktivasyonu</u>
<i>Belirteç</i>	Bcl2, <u>Kaspaz</u> , Bak, Bax, Bad	LC3, Beklin-1, ATG ailesi, FIP200	<u>RhoA</u> , ROCK, Cdc42	PARP1, TNF α , NF- κ B
<i>Morfoloji</i>	Hücre bütülmesi, Kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, <u>Apoptotik cisimcik oluşumu</u>	<u>Vakuol formasyonu, Lizozom ile füzyon</u>	Bir hücre, komşuluğunda bulunan hücreyi yutarak parçalar.	Hücre şişmesi, Membran bütünlüğünün bozulması
<i>İnflamatuvar Yanıt</i>	<u>İnflamatuvar yanıt yok</u>	<u>İnflamatuvar yanıt yok</u>	<u>İnflamatuvar yanıt yok</u>	<u>İnflamatuvar yanıt var</u>
<i>ATP Tüketimi</i>	ATP harcanır	ATP harcanmaz	ATP harcanmaz	ATP harcanmaz
<i>Hücre Etkisi</i>	Tek bir hücre etkilenir	Tek bir hücre etkilenir	Tek bir hücre etkilenir	Hücre grubu etkilenir

2.5.1. Otofaji mekanizması

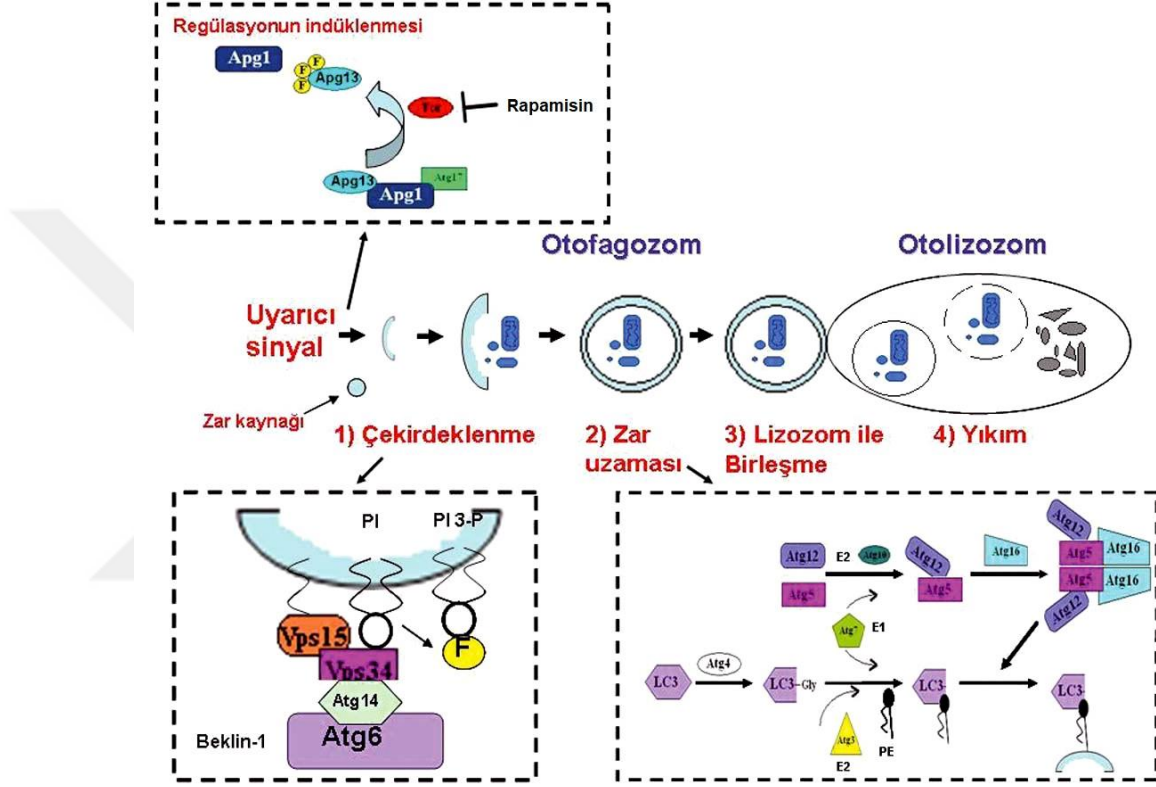
Otofagozom oluşumu sekanslar halinde çalışan bir seri proteinler tarafından kontrol edilir, bu proteinler şunlardan oluşmaktadır; otofaji indüksiyonundan sorumlu ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 kompleksleri, otofagozom oluşumunun başlatılmasından sorumlu sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi (BECN1, ATG14, VPS15, VPS34 ve AMBRA1) ve otofagozom çift membranının uzaması ve kapanmasında sorumlu ATG12–ATG5-ATG16L1 kompleksi ve MAP1LC3A/LC3 (ATG8 homolog)–fosfatidiletanolamin (PE) kompleksi (Şekil 2.7) (Devrim Öz Arslan, 2011).

Kor elementlerin yanı sıra birçok otofaji ilişkili (autophagy-related (ATG)) gen mayada karakterize edilmiştir ve memeli ortologları da otofaji için gereklidir (Wesselborg ve

Stork, 2015). Otofagozom maturasyonu ve dış membranının lizozom füzyonu ile içerik ve iç otofagozomun membranı amino asit ve diğer yapıtaşlarına dönüşmek üzere degrade edilerek hücre tarafından geri dönüştürülürler. Besin ve enerji ihtiyacına cevaben geri dönüşüm fonksiyonunun yanı sıra, otofaji hem proteinlerin hem de organellerin kalite kontrol mekanizmasında da bulunur (Singh ve Cuervo, 2011; Yin ve ark., 2016). Otofaji çeşitli iç ve dış stres sinyallerine cevaben indüklenir, örneğin; endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türleri birikimi, hipoksi ve bakteriyel enfeksiyon. Otofaji aktivasyonu, hatalı protein birikintilerinin ve bozuk organellerin ve hücre içi patojenlerin temizlenmesini sağlar (Wesselborg ve Stork, 2015).

Otofajik süreç membran öncülerinin uzaması ve sitozolik materyalleri ve hedef organelleri içine alan çift membranlı vesikülün (otofagozom) oluşumu ile başlar. ATG proteinleri otofagozomun uzaması ve oluşumundan sorumludurlar (Pyo ve ark., 2012; Rubinsztein ve ark., 2012). Mikrotübül ağı boyunca hareket ederek otofagozom asidik lümeni hidrolitik enzimleri aktive eden lizozom ile birleşerek otofagozomun içeriğini degrade eder ve amino asitler, nükleosidler ve diğer metabolitlerin sitoplazmaya salınmasıyla anabolik hücresel mekanizmasının geri dönüşümünü sağlarlar (Khandia ve ark., 2019; Lawrence ve Zoncu, 2019). Moleküler seviyede, otofaji mTORC1 ile kompleksi yeterli besin miktarı ve büyüme faktörlerinin varlığında serin/treonin kinaz ULK1/2 inaktivasyonu ile negatif regüle edilir (Alers ve ark., 2012). ULK1/2 içeren kompleks otofajik prosesin başlangıcını regüle eder ve besin yetersizliği ve/veya büyüme faktörü yokluğu nedeniyle inaktif mTORC1 varlığında AMPK aracılı fosforilasyon ile aktive edilir (Mack ve ark., 2012). ULK1 kompleksi, Beklin-1 ve sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) proteini olan VSP34 içeren sınıf II PI3K kompleksini aktive eder (Tassa ve ark., 2003; Thoresen ve ark., 2010). VPS34 fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üreten bir lipid kinazdır, otofagozomal membran uzaması ve vezikül uzamasında yer alan proteinlerin PI3P domaini (örn. WIPI1/2) ile eklenmesi için şarttır ve iki ubikütin-benzeri konjugasyon sisteminin aktivasyonu ile takip edilir. İlki ATG12-ATG5-ATG16L kompleksidir, bir E3-benzeri ligazdır LC3 ailesinden daha sonra otofagozomal membranla ilişkili olacak olan LC3, GATE16 and GABARAP'in lipidasyonundan sorumludur. ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi membranın kapanmasından önce membrandan ayrılırken otofagozom maturasyonunun fon regülasyonunu yapan

lipidlenmiş LC3 üyeleri (örn. LC3-II ya da LC3-PE) iç membranda bulunmaya devam ederler. Selektif otofaji durumunda LC3- ilişkili bölgeleri (LIR) ve bir ubiquitin-ilişkili domain (UBA) bulunan SQSTM1 gibi otofaji reseptörleri ubiquitinlenmiş organellerin ve yapıların otofagozoma selektif girişine izin verir (Şekil 2.7) (Arslan, 2011).



Şekil 2.7: Memeli hücrelerinde otofagozom oluşumu ve regülasyonu. Memeli otofagozom oluşumu açlık durumunda veya AMPK (direkt olarak ya da mTORC1 aktivasyonu ile) düşük enerji durumlarında, mTORC1'in baskılanması ile sağlanan ULK1 kompleks (ULK1, ATG13, FIP200 ve ATG101) aktivasyonu ile indüklenir. ULK1 aktive olduğunda endoplazmik retikulum membranına transloke olur ve sınıf III fosfatidilinositol-3-fosfat (PtdIns3P) kinaz kompleksini (VPS34, BECN1, VPS15, AMBRA1, UVRAG, ATG14 ve SH3GLB1 içeren) otofagozom oluşumunun başlaması için PtdIns3P oluşumu ve çift ZFYVE'nin bağlanmasıyla koordine eder. İki ubiquitin benzeri sistem; ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleks (ATG5, ATG7, ATG10, ATG12 ve ATG16L1) ve LC3-fosfatidiletanolamin (PE) konjugasyon sistemi (ATG3, ATG4, ATG7 ve LC3) daha sonra fagozom oluşumu için fagopor membranının uzamasını sağlar (Arslan, 2011).

2.5.2. Otofajinin Düzenlenmesi

Açlık, hipoksi ve çeşitli stres koşulları, hücredeki otofajik aktiviteyi uyarmaktadır. Otofajik aktivitenin kontrolünde, Tor protein kompleksi önemli bir rol oynamaktadır. Tor, ilk olarak mayada mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilmiş bir ilaç olan rapamisinin hedefi olarak ortaya çıkarılmış ve ünlenmiştir. Aslında Tor, hücrede protein sentezi ve

hücrel büyüme kontrol eden bir kinazdır. Bu proteinin baskılanması hem mayalarda hem de memelilerde otofajiyi aktif hale getirir. Açlık benzeri stres durumlarında, protein sentezini yönlendiren bir mekanizmanın bloke olmasının, protein yıkımı ile ilgili bir hücrel olay olan otofajinin aktivasyonu ile birlikte regüle olması mantıklı görülmektedir. Zira besinin bol olduğu koşullarda maya Tor proteini, otofaji proteinlerinden biri olan Atg13'u fosforile etmekte ve otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumunda ise Tor aktivitesinin düşmesi sonucunda Atg13 defosforile olarak otofaji ile bağlantılı Atg1 adlı serin treonin kinaza bağlanmaktadır. Atg1 kinazının aktivasyonu direkt olarak otofajinin uyarılmasına neden olmaktadır (Scott ve ark., 2007; He ve Klionsky, 2009). Memelilerde bu kompleksin karşılığı ULK: Atg13: FIP200 (200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) proteinleridir. Çok yakın zamanda ULK1 ve ULK2 proteinlerinin mTOR kinaz ve AMPK (Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz) ile direkt etkileşerek ve memelilerde otofajinin başlamasına eşlik ettiği gösterilmiştir (Egan ve ark., 2011; Roach, 2011). Bu durumun aksine Tor yolağında yer alan proteinlerden ribozomal S6 proteinin hedefi olan S6K proteinin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (Klionsky ve ark., 2005; Datan ve ark., 2014). Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (Akt/ PKB), mitojenik uyarılara yanıt sonucu hücre büyümesinin kontrolünde en etkili sinyal yollarından birisidir.

Sınıf I PI3K, PtdIns(3,4)P₂ fosfat ve PtdIns(3,4,5)P₃ oluşumunu sağlamakta ve bu ürünler Akt/PKB yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır (P. Liu ve ark., 2009). Aktif haldeki Akt de Tor'u aktive ederek otofajiyi bloke etmektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile ters yönde çalışarak otofajinin artırılmasında görev yapmaktadır. Nitekim PTEN molekülünde meydana gelen mutasyonların otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir (Maiuri ve ark., 2009; Santana-Codina ve ark., 2017).

Yukarıda bahsedilen PI3K'lerden farklı bir kinaz olan sınıf III PI3K VPS34 ve ürünü PtdIns3P'nin otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı yine ilk olarak mayada gösterilmiştir. Mayada PI3K kompleksinin görevi, VPS34'un aktivitesini düzenlemektir.

PI3K kompleksi, Atg6 (memelilerde Beklin-1), Atg14, VPS15 ve PI3K VPS34 proteinlerinden oluşmaktadır ve daha önce de bahsedildiği gibi, PI3K bağlayıcı proteinlerle otofajik keseciği oluşumunu başlatmaktadır. Memelilerde, VPS34 aktivitesini

düzenleyen AMBRA1, SH3GLB1, UVRAG, Rubicon gibi proteinler de PI3K kompleksinin birer üyesidirler (Kang ve ark., 2011). PI3K kompleksinin otofaji için gerekli olmasından dolayı, PI3K inhibitörü bir ilaç olan 3-metiladenin (3-MA) yaygın olarak kullanılan bir otofaji inhibitörüdür (Wu ve ark., 2010). PI3K inhibitörleri hem sınıf I ve sınıf III PI4-3 kinaz enzimlerini inhibe etmekte ve böylelikle otofajiyi azaltmaktadırlar (Burman ve Ktistakis, 2010). Tüm bunlara ek olarak, yakın zamanda otofagozomal zar oluşumunda LC3 molekülü ve WIPI (Fosfoinositit ile etkileşen WD-tekrarı olan protein, mayadaki karşılığı Atg18) proteinlerinin PI3K kompleksi tarafından oluşturulan PtdIns3P'ye bağlandığı ve mTOR'un yolağı ile etkileştiği bildirilmiştir. WIPI proteini hücrede otofajinin izlenmesi için bir yöntem olma niteliği taşımaktadır (Yoshii ve Mizushima, 2017).

2.5.3 p62

p62, SQSTM1 olarak da bilinmektedir, selektif otofajide görev alan bir kargo proteinidir (Bjorkoy ve ark., 2009). p62 proteininde bulunan LIR bölgesi sayesinde direkt olarak LC3 ile etkileşmektedir ve bu da p62'nin otofajiyile direkt yıkımını sağlar (Komatsu ve ark., 2007; Pankiv ve ark., 2007). Bunun yanı sıra p62 proteininde bulunan N-terminal Phox-BEM1 (PB1) bölgesi de substratların proteazoma taşınmasını sağlamaktadır (Shin, 1998; Myeku ve Figueiredo-Pereira, 2011). Dolayısıyla p62 hem otofajide hem de proteazomda protein yıkımına katkıda bulunmaktadır. p62 proteini otofagozoma gidecek ubiquitinle işaretlenmiş proteinlere ise, içerdiği ubiquitin-ilişkili bölge ile bağlanır.

p62 ile otofaji arasındaki ilişki ise oldukça karmaşıktır. Otofaji aktivasyonunun veya baskılanmasının p62 ekspresyonunu arttırdığına dair literatürde tartışmalı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, bazı hücre hatlarında otofajinin farmakolojik veya genetik inhibisyonu, p62 ekspresyonunu arttırmaktadır (Bjorkoy ve ark., 2005; Komatsu ve ark., 2005; Hara ve ark., 2006; Ebato ve ark., 2008; Masiero ve ark., 2009; Z. Tian ve ark., 2014). HeLa hücre hattında yapılan bir çalışmada da p62 overekspresyonunun otofagozom sayısını etkilemediği ve yine p62-knockdown HeLa hücrelerinde otofajik sürecin etkilenmediği bildirilmiştir (Korolchuk ve ark., 2009). Bu da p62'nin otofagozom oluşumuna bir etkisi bulunmadığı göstermektedir. Bazı hücre hatlarında ise p62 overekspresyonu, protein birikimini arttırmış ve hücrenin hayatta kalımı üzerinde

koruyucu bir etki göstermiştir (Bjorkoy ve ark., 2005; Paine ve ark., 2005; Gal ve ark., 2007). Ancak kardiyomiyositlerde p62 delesyonu sonrası otofagozom oluşumu engellenmiş, hücre hasarı artmış ve hücre hayatta kalımı azalmıştır (Su ve Wang, 2011). Bunun yanı sıra, p62'nin susturulması karsinoma hücre hatlarında otofaji aktivasyonu ve hücre ölümü ile sonuçlanmıştır (Nihira ve ark., 2014). Dolayısıyla p62'nin otofajiye etkisi hücre-bağımlı olarak görünse de p62 delesyonu hemen hemen tüm hücre hatlarında hücre ölümü ile sonuçlanmıştır.

p62'nin yıkımı otofaji-bağımlı olarak gerçekleştiğinden, p62 miktarının artması çoğu zaman otofajinin inhibe olmasına bağlıdır (Bjorkoy ve ark., 2005). Otofaji yetersizliği bulunan farelerde p62'nin hücre içerisinde ve dokularda biriktiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2007; Nakai ve ark., 2007). p62 birikimi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda, karaciğer hastalıklarında ve miyofibriller miyopatilerde de gözlenmiştir (Kuusisto ve ark., 2001; Zatloukal ve ark., 2002; Kuusisto ve ark., 2008; Olive ve ark., 2008). Ancak genel olarak p62 otofaji inhibisyonunu veya otofajik defektleri göstermek için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Bjorkoy ve ark., 2005; Filimonenko ve ark., 2007; Gal ve ark., 2007; Hara ve ark., 2008).

2.5.4 LC3

LC3 ilk başta MAP1A ve MAP1B'nin üç hafif zincirinden biri olarak keşfedilmiş ve izole edilmiştir (Mann ve Hammarback, 1994). Otofajideki spesifik rolü bulunmadan önce mikrotübül birleşimi ve ayrışmasında rolü olduğu düşünülmektedir (Kabeya ve ark., 2000; Tanida ve ark., 2005). Otofajideki rolü keşfedildiğinde, LC3'ün iki adet formu olduğu görüldü. Otofagozom membran oluşumu sırasında sitozolik LC3 (LC3-I) /Atg8 kompleksi, Atg4B tarafından kesilir ve kesilen LC3-I, Atg7 ve Atg3 yardımıyla PE ile konjuge olarak LC3-II formunu oluşturur (Kabeya ve ark., 2000). Otofagozomun, lizozom ile füzyonu sonrasında, otofagozomal membran içerisinde bulunan LC3-II proteinleri de yıkılır. Dolayısıyla LC3-II seviyesindeki değişimler otofajik aktiviteyi ölçmek için kullanılabilir (Tanida ve ark., 2005). LC3-I ve LC3-II protein miktarları (sırasıyla 16-18 ve 18-20 kDa) Western Blot gibi yöntemlerle belirlenir.

Otofagozom oluşumundaki anahtar rolüne ek olarak LC3 proteini selektif otofajide kargonun tanınması ve otofagozom içerisinde alınmasında da önemlidir (Birgisdottir ve

ark., 2013; Wild ve ark., 2014). Otofaji reseptörlerinde bulunan LIR bölgeleri, LC3 proteininde bulunan UBB ile etkileşim sağlar. Burada p62 ve LC3 arasındaki etkileşim sayesinde hedef proteinler otofagozom içerisine alınır.

2.5.5. Beklin-1

Beklin-1 ilk olarak 1998 yılında Beth Lavine ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (X. H. Liang ve ark., 1998). İlk olarak anti-apoptotik bir protein olan Bcl2 ile etkileştiği bilinmekteydi (X. H. Liang ve ark., 1998). Daha sonra otofaji ve tümör baskılanmasındaki rolleri keşfedildi (Aita ve ark., 1999; X. H. Liang ve ark., 1999). Beklin-1, VPS34 ve VPS15 ile kompleks oluşturarak PtdIns-3P üretimini ve ayrıca otofajik proteinlerin pre-otofagozomal yapı içerisine taşınmasını sağlar. AMBRA1, bu kompleksi dynein hafif zincirlerine bağlar, daha sonra AMBRA1'in fosforilasyonu bu kompleksi mikrotübüllerden ayırarak ER lokalizasyonunu ve fagozom biyogenezini kolaylaştırır (Gao ve ark., 2016). Bu komplekse daha sonra Atg14/Barkor, UVRAG ve Rubicon proteinleri de katılır, ancak Beklin-1/VPS34/VPS15 kompleksinin fosforilasyonu, PtdIns-3P üretimi ve dolayısıyla otofajinin başlaması için esansiyeldir (Matsunaga ve ark., 2010).

Beklin-1 dört adet yapısal bölge içermektedir. Bunlar; Bcl-2-homoloji-3 (BH3) bölgesi, coiled-coil bölgesi (CCD), evrimsel korunmuş bölge (ECD) ve C-terminal β - α -tekrarlı otofaji spesifik bölge (BARA). BH3 bölgesi, Bcl2/Bcl-XL ile etkileşime geçerek otofagozom biyosentezinin baskılanmasını sağlar (Pattingre ve ark., 2005). Bu sayede Beklin-1, otofaji ile apoptoz arasında bir köprü görevi görür (Levine ve ark., 2008). JNK1 aracılığıyla Bcl2'nin fosforilasyonu, Bcl2/Beklin-1 kompleksinin ayrılmasına yol açarak otofajinin aktivasyonunu sağlar (D. Tang ve ark., 2010; Song ve ark., 2018). Beklin-1, Bcl2 ile bağlı olmadığında fosforilasyon aracılığıyla tek başına otofajiyi indükleyebilir (Pattingre ve ark., 2005).

PtdIns-3P üretimi otofajinin başlangıcı için önemlidir. Beklin-1/Atg14/VPS34 kompleksi, ULK1 ya da ULK2 ile fosforile olur ve PtdIns-3P oluşumu sağlanır (Russell ve ark., 2013). ULK1 aracılı Beklin-1 fosforilasyonu aynı zamanda otofagozom matürasyonuna da katkıda bulunmaktadır (Russell ve ark., 2013). Ancak Beklin-1 fosforilasyonu farklı şartlarda farklı enzimler tarafından gerçekleştirilebilmekte, dolayısıyla otofaji farklı şartlarda indüklenebilmektedir. Örneğin, açlık esnasında ULK1 Beklin-1'i fosforilleyerek

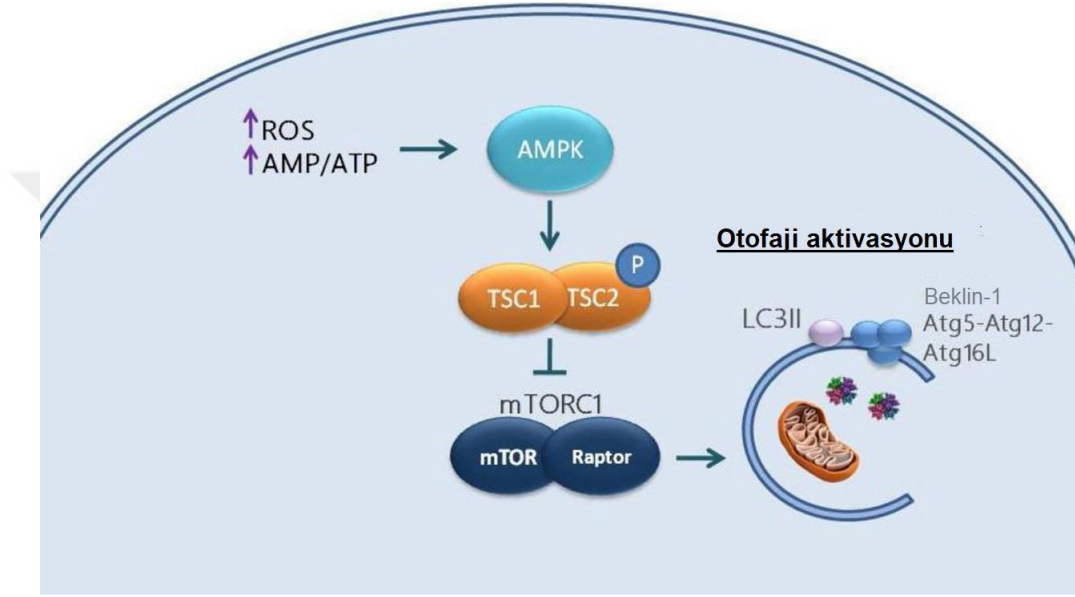
otofaji aktivasyonunu sağlar (J. M. Park ve ark., 2018). Hipoksi ya da glutamin yokluğunda ise Beklin-1, PGK-1 enzimi ile fosforillenmektedir (Qian ve ark., 2017). Glukoz yokluğunda da AMPK-aracılı fosforilasyon gerçekleşmektedir (Y. C. Kim ve Guan, 2015). Farklı enzimler tarafından fosforile olabilmesine rağmen, Beklin-1 fosforilasyonu otofajinin başlaması için kritik rol oynamaktadır.

2.6. Plasentada Otofaji

Otofaji ilişkili proteinler olan BCN-1, LC3B ve DRAM'ın varlığı insan plasentasında gösterilmiştir. LC3 maturasyonu (LC3II oluşumu) sinsisyo ve sitotrofoblastta saptanmıştır. Otofajinin plasentanın anti-viral savunmasında rol oynadığı yakın tarihte ortaya konmuştur. Atg9p proteininin memeli homoloğu olan APG9L2 sitotrofoblastlardan sinsisyotrofoblast oluşumu sırasında 4 kat azalış gösterir. Bu durum otofajinin trofoblast gelişimi sırasında regüle edildiğini gösterir. mTORC1 komponentlerinden biri olan Deptor'un maternal strese maruz kalan plasental villusta ve trofoblast hücre hattında azaldığı görülmüştür. Bu durum maternal stresin plasental otofajiyi etkilediğini göstermektedir. İnsan plasentası hemokoryaldır, dolayısıyla maternal kan koryon ile doğrudan temas halindedir ve plasenta, maternal kandaki stres faktörlerine doğrudan maruz kalır. Preeklampsi ve FGR gibi durumlarda plasentadaki morfolojik bozukluklardan ötürü intravillöz boşluğa dolan kan miktarı azalır. İleri preeklampitik ve FGR olan gebeliklerde plasentadaki otofajinin arttığı gösterilmiştir. Otofajinin ayrıca trofoblast invazyonunda da görevi olduğu ortaya konulmuştur. Hipoksi indüklü otofajinin ekstrasvillöz trofoblast (EVT) invazyonunu arttırdığı görülmüştür. Gestasyonun başında trofoblastlarda otofaji çok yüksek miktardayken gebelik ilerledikçe azalmaktadır (Nakashima ve ark., 2017).

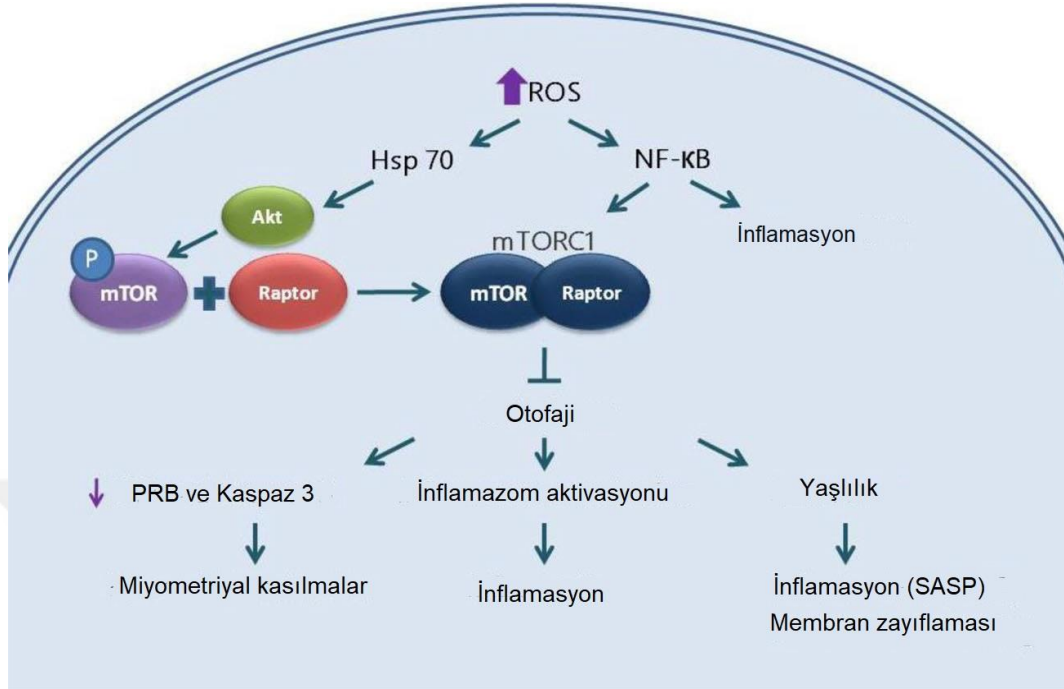
İlk trimesterdeki maternal-fetal arayüzde kan tedariğinin az olmasından kaynaklanan düşük besin ve enerji miktarı plasentada adenosin monofosfat (AMP)/ adenzin trifosfat (ATP) miktarının artmasına neden olur. Bu koşullar altında 5'-AMP-aktive protein kinaz (AMPK) enziminin üretimi artar. AMPK mTORC1'u fosforilleyerek intrasellüler aktivasyonunu engeller. Ek olarak AMPK, tüberkiloz skleroz kompleks (TSC) 1 ve 2'yi fosforilleyerek mTORC1 kompleksi haline getirir. Bu mekanizma şekil 2.8'de özetlenmiştir (Şekil 2.8). Bu durumda otofaji artan besin ihtiyacına karşı hayatta kalımı

ve endometriyum invazyonunu arttırmak için artmıştır. Gestasyonun 12. haftası yaklaşırken EVT endometriyumun derinlerine invaze olur ve maternal kana ulaşarak besin ve oksijence zengin bir ortama kavuşur. Oksijen miktarıyla birlikte artan ROS miktarı ekstravillöz trofoblastların homeostazisini sağlamak adına otofajide daha da artışı indükler (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).



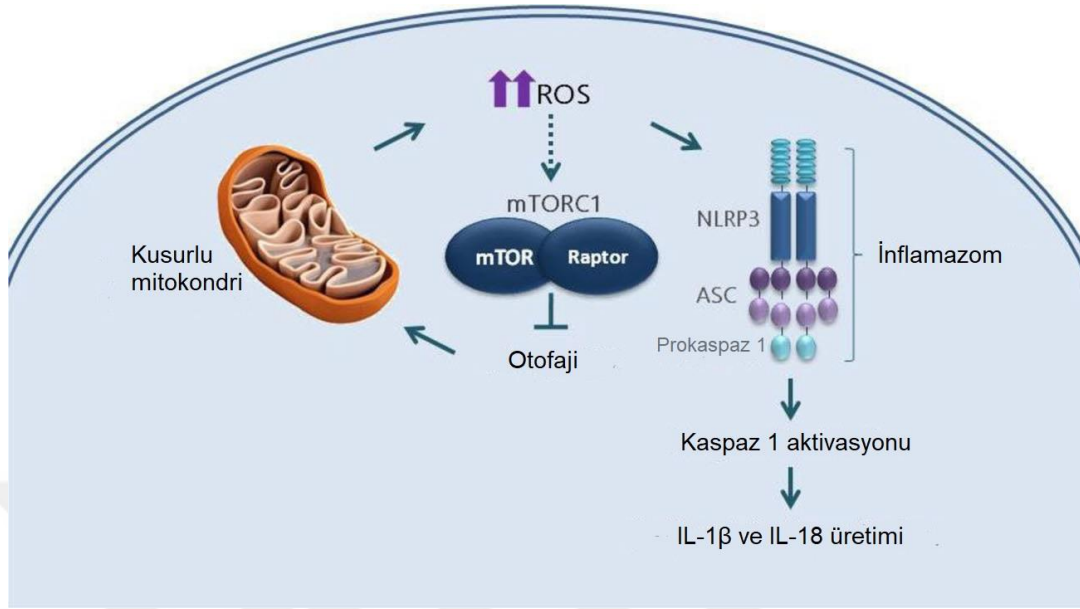
Şekil 2.8: İlk trimesterde otofajinin regülasyonu. Artan ROS ve AMP/ATP miktarı AMPK'ı aktive eder; AMPK, TSC1 ve TSC2'yi fosforilleyerek mTORC1'i inhibe eder. mTOR'un inhibisyonu otofaji ilişkili proteinler olan LC3II, beclin-1 (BCN-1) ve Atg protein kompleksinin üretimini sağlayarak otofajiyi aktive eder (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).

Term'e gelindiğinde ise uterustaki büyüyen fetüsün sıkışması, artan besin ve enerji ihtiyacı, oksidatif stresin büyük ölçüde artmasına neden olur. ROS'a cevaben upregüle olan pro-inflamatuvar sitokinler sayesinde NF-kB aktif olur. Artan ROS ve inflamasyon, 70 kDa ısı şok proteini Hsp70'ın indüksiyonuyla sonuçlanır. Hsp70 hücre içi proteinlere bağlanarak stres koşullarında konformasyonlarını ve fonksiyonlarını korumalarını sağlar. Hem NF-kB hem Hsp70 otofaji inhibitörleridir. Azalan otofaji miktarı vajinal doğum sonrası alınan plasenta örneklerinin ortak özelliğiyken bu sezeryan doğumlara ait plasentalarda görülmez. Dahası, termdeki oksidatif stres, amniyotik epitel hücrelerinin ve koryonik hücrelerin telomerlerinin kısalarak yaşlanmasıyla ilişkilidir (Menon ve ark., 2014; Poletini ve ark., 2015). ROS miktarındaki artış ilk trimesterde otofaji artışıyla ilişkiliyken; termde pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu ile otofaji inhibisyonu başlar (Şekil 2.9) (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).



Şekil 2.9: Termde otofajinin ROS tarafından kontrolü. Terme yaklaştıkça artan ROS miktarı Hsp70 ve NF-κB indüksiyonuna neden olur. Hsp70, Akt yoluyla mTOR'un aktivasyonu ile otofajiyi inhibe ederken; uzayan NF-κB aktivitesi doğrudan mTORC1 aktivasyonu ile otofajiyi inhibe eder. Değişen otofaji aktivitesi, kaspaz-3 ve progesteron reseptörü B (PR-B)'nin sınırlı üretimiyle birlikte anormal proteinlerin hücre içi birikimiyle miyometriyal kasılmalara neden olur. Bununla beraber, otofajinin düşüşüyle desidual hücrelerde yaşlanma başlar ve plasental zarlar zayıflar. Yaşlanan hücrelerde yaşlanma-ilişkili sekretuar fenotip (SASP) görülür. Bu fenotipteki hücreler yüksek seviyelerde IL-6, IL-8, MCP, MIP ve GM-CSF gibi pro-inflamatuvar sitokinler salgırlar (Campisi, 2013). SASP sonrası üretilen pro-inflamatuvar sitokinler de doğumu uyarır (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).

Doğumun başlamasıyla, ROS-otofaji ilişkisi inflamazomları aktive eder. Toll-benzeri reseptör NLRP3, sitoplazmada bulunur ve intrasellüler değişikliklere bağlı olarak aktive olarak apoptoz-ilişkili spek-benzeri protein (ASC) ve prokaspaz-1'e bağlanarak inflamazomu oluşturur. Bu kompleks daha sonra prokaspaz-1'i keserek, IL-1 β ve IL-18'e bağlanan aktif kaspaz-1'i oluşturur. Bu proinflamatuvar sitokinler aktifleşerek hücreden salınırlar. Hücre içi inflamazom miktarı normalde otofaji ile kontrol edilerek fazla sitokin salınımı önlenir. Yaşlı ve bozulmuş mitokondriden salınan ROS, NLRP3'ün ana aktivatörüdür. Normalde yaşlanmış ve hasarlı mitokondri mitofaji ile ortadan kaldırılır fakat inflamazom oluşumu için bu mitokondrilere ihtiyaç vardır. Dolayısıyla terme yaklaştıkça otofajinin azalması bu nedenledir (Şekil 2.10) (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).



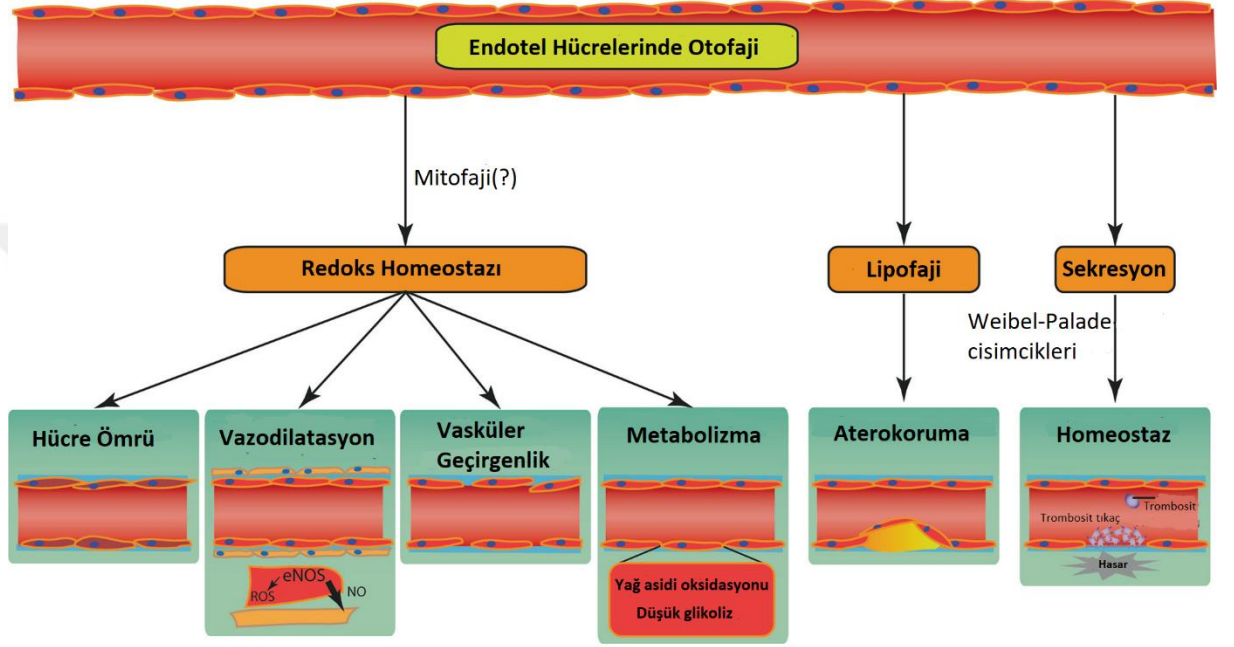
Şekil 2.10: Otofajinin inhibisyonu ve artan ROS miktarıyla inflamazomların oluşumu. Azalan otofaji miktarı hasarlı mitokondrilerin birikimine dolayısıyla da artan ROS miktarına neden olur. Bu NLRP3 aktivasyonunu ve onun ASP'ye ve prokaspaz-1'e bağlanarak inflamazomun oluşmasını sağlar. İnflamazom, prokaspaz-1'i kesip aktif kaspaz-1'i oluşturarak proinflamatuar sitokinler IL-1 ve IL18 oluşumunu sağlar (de Andrade Ramos ve Witkin, 2016).

2.7. Endotel Hücrelerinde Otofaji

Endotel hücrelerinde otofajinin rolleri yeni yeni açığa çıkarılmaktadır. Vasküler otofajinin prenatal vasküler gelişimde ve yaşa bağlı gelişen vasküler patolojilerde rolü olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır. Otofajinin embriyogenez sırasında vasküler gelişimi desteklediği (S. T. Kim ve ark., 2013) ve Atg7, Atg8 ve Beklin-1 gibi anahtar otofaji proteinlerinin vasküler pleksuslardaki ekspresyonunun, endotel-endotel bağlantıları ile ilişkili olduğu ve kanamayı önlediği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2016). Sağlıklı organizmalarda endotel hücreleri genellikle sessiz durumdadır, ancak mikroçevresel değişimlere ya da uyartılara dinamik olarak cevap verme yeteneğine sahiptir. Bu uyartılara örnek olarak, pro-anjiyogenik sinyaller, düşük oksijen veya besin ulaşılabilirliği gibi olaylara örnek verilebilir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, otofajinin endotel hücrelerinde dinamik bir mekanizma olduğunu ve bu hücrelerin biyoenerjetik ve biyosentetik ihtiyaçlarını değişen mikroçevreye, anjiyogenik sinyallerin varlığına ya da intrinsik veya ekstrinsik hasarlara göre ayarladığını belirtmektedir. Buna karşın; besin tükenmesi ya da büyüme sinyallerinin yokluğunda otofajinin düzensiz olması, endotel hücre disfonksiyonuna ve otofajik hücre

ölümüne yol açabilir (Chau ve ark., 2003; Domigan ve ark., 2015; Vion ve ark., 2017). Ancak otofajinin endotel fonksiyonlarını modüle etmedeki rolü hala tartışmalıdır. Otofajinin endotel hücreleri üzerindeki olası rolleri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (Şekil 2.11).

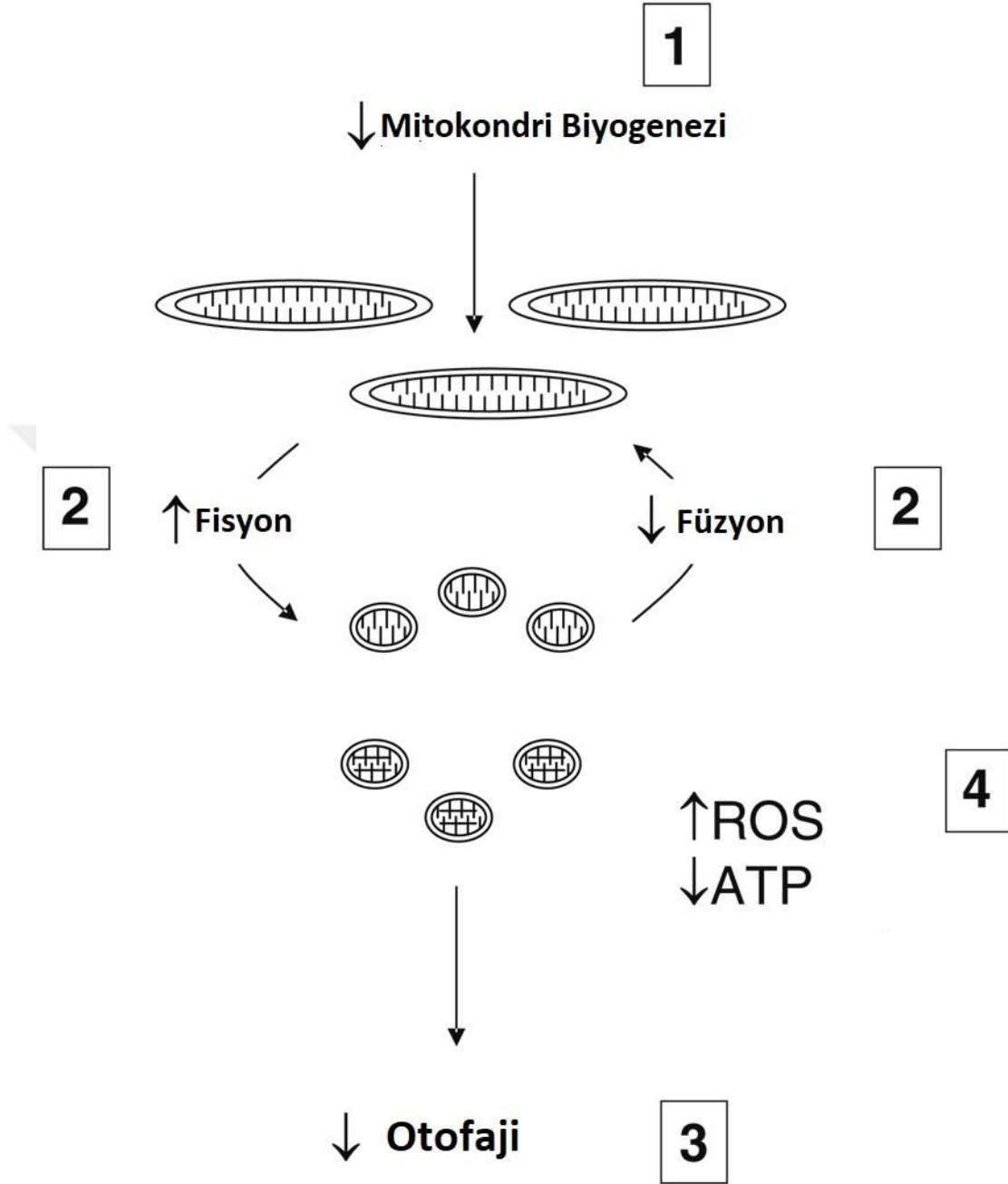


Şekil 2.11: Endotel hücrelerinde otofajinin önerilen rolleri. Endotel hücrelerinde otofajinin yeterliliği, düşük seviyeli oksidatif stres ile ilişkilidir ve bu nedenle redoks homeostazına katkıda bulunur. Böylece otofaji, ROS-aracılı endotel hücre fonksiyonlarını düzenler ve şu olaylara katkıda bulunur: (1) vasküler hücre ömrünün artması; (2) nitrik oksit (NO) üretiminin artması ve vazodilatasyon; (3) endotelial bariyer bütünlüğü ve damar geçirgenliğinin korunması; (4) yağ asidi (FA) alımı ve mitofaji yoluyla oksidasyon; (5) lipofaji ile lipid homeostazını sağlayarak aterosklerotik plak oluşumuna karşı koruma sağlanması; (6) Weibel-Palade cisimciklerinden von Willebrand faktörünün salgılanmasını düzenleyerek hemostaz (Schaaf ve ark., 2019).

2.8. Hiperglisemik Koşullarda Endotel Hücrelerinde Otofaji

Hiperglisemi kaynaklı endotel hücre disfonksiyonunun en önemli nedenlerinden biri, endotel hücrelerinde ROS üretiminin artmasıdır. Aşırı miktarda ROS üretimi hücreleri strese sokarak hücre ölümüne yol açar. ROS üretiminin artmasının en büyük sebebi de mitokondriyal disfonksiyondur. Diyabette mitokondri biyogenezi, dinamiği ve ROS üretimi yakın zamanda önem kazanmış konulardır (Suen ve ark., 2008; Twig, Hyde, ve ark., 2008; Brooks ve ark., 2009). Mitokondri biyogenezinden sonra oluşan mitokondriler, tekrar yıkılana kadar fisyon denilen küçük mitokondriler oluşturma ve füzyon denilen kompleks ağlar kurma döngüleri geçirirler. Bu süreçlerin arasındaki denge, mitokondriyal

dinamik olarak adlandırılır (Menzies ve Gold, 1971; Twig, Hyde, ve ark., 2008). Mitokondriler yıkılacakları zaman fisyon geçirerek mitofaji (mitokondrinin otofajiyle eliminasyonu) ile yıkılırlar. Ancak diyabet gibi patolojik durumlarda fisyon ile füzyon arasındaki denge fisyon tarafına kayarak mitokondrilerin kompleks ağ kuramamasına ve disfonksiyonel mitokondrilerin birikimine yol açar (Şekil 2.12). Bu durum otofajinin inhibisyonuna neden olur ve bunun sonucunda hem ATP üretiminde bozukluklar hem de ROS üretiminde artış görülür (T. Yu ve ark., 2006; Twig, Elorza, ve ark., 2008; Twig, Hyde, ve ark., 2008; T. Yu ve ark., 2008). Diyabetik koşulların mitokondriyal biyogenezi, füzyonu ve mitofajiyi engellediğine dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır (Zorzano ve ark., 2009; Goldman ve ark., 2010).



Şekil 2.12: Diyabetes mellitusta mitokondriyal yaşam döngüsü ve dinamikleri: 1. Mitokondriyal biyogenez azalır; 2. Fisyon ve füzyon arasındaki denge bozulur, bu da fisyonun artıp füzyonun azalmasına ve normal mitokondriyal ağların kaybına yol açar; 3. Otofaji normalde hasarlı ve yaşlanmış mitokondrileri ortadan kaldırır, ancak diyabet, disfonksiyonel mitokondri birikimine yol açarak otofajiyi baskılar. 4. Disfonksiyonel mitokondri birikimi ise ROS üretiminin artmasına ve ATP üretiminin azalmasına yol açar (Tabit ve ark., 2010).

Ancak hiperglisemik koşullarda inkübe edilen endotel hücreleri ile yapılan çalışmalarda, hipergliseminin otofajiye olan etkisi kısmen tartışmalıdır. Hiperglisemik koşulların

endotel hücrelerindeki otofajiyi indüklediğine veya baskıladığına dair oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, endotel progenitör hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonlarının otofajiyi mTOR fosforilasyonuna bağlı olarak baskıladığı bildirilmiştir (D. Tian ve ark., 2020). Ayrıca diyabetik hastalardan izole edilen endotel hücrelerinde de p62 miktarının arttığı, dolayısıyla otofajinin p62 birikimine bağlı olarak baskılandığı raporlanmıştır (Fetterman ve ark., 2016). p62 upregülasyonuna bağlı olarak otofajinin baskılandığı fare endotel hücrelerinde (Xie ve ark., 2016) ve sıgır aortik endotel hücrelerinde gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Otofajinin yanı sıra, yüksek glukoz konsantrasyonlarının endotel hücrelerindeki mitofajiyi de baskıladığı bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2018).

Buna karşın, hiperglisemik koşullarda endotel hücrelerinde otofajinin indüklendiğini raporlayan çalışmalar da oldukça fazladır. Endotel progenitör hücreleriyle yapılan bir çalışmada, yüksek glukoz muamelesi sonrası hücrelerde otofajinin indüklendiği bildirilmiştir (K. A. Kim ve ark., 2014). Hiperglisemik koşulların otofajiyi indüklediğine dair bilgiler farklı modeller kullanılarak gösterilmiştir. Örneğin, metilglioksal, hiperglisemiye bağlı olarak hücrelerde oluşan ana AGE, kullanılarak yapılan çalışmalarda MGO'nun otofajiyi indüklediği, ancak otofajinin indüklenmesinin endotel hücrelerinin anjiyogenez kapasitesini ve hücrelerdeki VEGFR2 miktarını azalttığı bildirilmiştir (H. Liu ve ark., 2012; Lee ve ark., 2020).

Yukarıdaki bilgilere dayanarak hiperglisemik koşulların endotel hücrelerindeki otofajiye olan etkisinin farklılık gösterdiğini söylemek mümkündür. Bu farklılıkların neden kaynaklandığını daha iyi anlayabilmek için otofaji inhibitörlerinin kullanıldığı yeni çalışmalar oldukça yararlı olacaktır. Bunun yanı sıra hiperglisemik koşullarda otofajinin indüklenmesinin veya baskılanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması, bu konudaki belirsizliklere ışık tutacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Göbek Kordonu Eldesi ve HUVEC İzolasyonu

12 adet göbek kordonu, annelerden onam izni alınması sonucunda doğum sonrasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nden elde edildi (70904504/645). Tamamen steril koşullarda korunan göbek kordonlarından HUVEC izolasyonu gerçekleştirildi. Steril koşullarda laboratuvarımıza getirilen göbek kordonlarının ven damarları, öncelikle gözle görülen kan pıhtılarından temizlendi ve %3 Penisilin-Streptomisin (P/S) (Gibco, Katalog No: 15140-122) ve %3 Amfoterisin B (Gibco, Katalog No: 15290-018) içeren 1X Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Gibco, Katalog No: 14175-053) çözeltisi ile yıkandı. İyice temizlenen venin bir tarafı pens ile kilitlenerek içerisine, önceden ısıtılmış 20 mL Kollajenaz/Dispaz (Roche, Katalog No: 11097113001) enjeksiyonu yapıldı ve diğer kısmı da pens ile kilitlendi. Daha sonra göbek kordonu 37°C'ye ısıtılmış su banyosunda 45 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan göbek kordonunun içerisindeki enzim-hücre karışımı, 50 mL'lik temiz steril bir falkona alınarak 800 rpm'de 7 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Kalan pellet ise 5 mL'lik %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %3 Penisilin-Streptomisin (P/S), %3 Amfoterisin B ve endotelyal büyüme faktörleri içeren M199 besiyeri (Gibco, Katalog No: 21180-021) ile çözülüp, 25 cm²'lik önceden jelatinlenmiş flasklara ekildi. Hücrelerin yapışması için 1 gün beklendikten sonra, hücre morfolojileri kontrol edildi ve ilk gün, besiyeri aspire edilerek; %10 Fetal Bovin Serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, Katalog No: SH3000071.03), %1 P/S, %1 Amfoterisin B ve endotelyal büyüme faktörleri (Lonza, Katalog No: CC-4176) içeren M199 besiyeri eklendi. Bu aşamadan sonra hücreler uygun konfluensiye ulaşana kadar her 3 günde bir temiz besiyeri değişimi yapıldı. Uygun konfluensiye ulaştıklarında HUVEC'ler 75 cm²'lik önceden jelatinlenmiş flasklara pasajlandı.

3.1.1 HUVEC Pasajlanması

Pasajlama işlemi için ortamdan besiyeri aspire edildikten sonra, 3 mL 1x %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco, Katalog No: 25200-056) eklenerek hücreler 37°C'de inkübe edildi ve ara ara mikroskop altında jelatinden ayrılmaları kontrol edildi. Jelatinden ayrılan hücrelerin üzerine 3 mL Trypsin Nötralize Edici Solüsyon (TNS) (Gibco, Katalog No: R-002-100) ve 3 mL M199 besiyeri eklenip elde edilen karışım, 15 mL'lik temiz falkona alındı. 800

rpm'de 7 dakika santrifüjlenen falkondan süpernatant atıldı ve pellet 5 mL besiyerinde çözüldü. Çözülen pellet, önceden jelatinlenmiş ve 5 mL besiyeri eklenmiş 25 cm²'lik flaska ekildi.

3.2. In vitro Ortamda Hiperglisemik Koşulların Oluşturulması

HUVEC'ler yeterli sayıya ulaştığında, deney grupları için özel besiyerleri hazırlandı. Besiyerine serum eklenmedi ve sadece endotelial büyüme faktörü içeren M199 besiyeri kullanıldı. Deney grupları şu şekilde oluşturuldu;

5,5 mM D-Glukoz (Sigma, Katalog No: G7021-1KG) içeren besiyerinde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen HUVEC grubu,

17 mM D-Glukoz içeren besiyerinde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen HUVEC grubu,

25 mM D-Glukoz içeren besiyerinde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen HUVEC grubu,

Deney grupları için toplamda 24 adet önceden jelatinlenmiş 75 cm²'lik flask kullanıldı. Her bir flask için 10 mL özel besiyeri kullanıldı, yukarıda belirttiğimiz farklı glukoz konsantrasyonları ile hazırlanan besiyerleri kullanılarak hücreler yukarıdaki protokole göre bu flaslara pasajlandı. Daha sonra gen analizi için kullanılacak HUVEC'lerin besiyeri uygun deney grubu saatlerine göre aspire edildi ve 1 mL Trizol Reagent (Invitrogen, Katalog No: 15596-026) çözeltisi eklenerek kazıyıcılar ile kazınıp kriyotüplere aktarıldı ve deney için kullanılana kadar -80°C'de saklandı. Protein analizi için kullanılacak HUVEC'lerin besiyeri uygun deney grubu saatlerine göre aspire edildi ve 750 µL 2X Laemmli buffer (Sigma, Katalog No: S-3401) eklenerek kazıyıcılar ile kazınıp kriyotüplere aktarıldı ve deney için kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

3.3. SDS-PAGE Western Blot

HUVEC'lerden hazırlanan numuneler 5 dakika 95 derecede kaynatıldı. Çalışılacak olan proteinlerin kilo dalton ağırlıkları dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 30 mikrogram/ml oranında protein içeren numuneler yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 140V 50mA'de 15 dakika, sonrasında ise 160V 50mA'de jelin sonuna kadar yürütüldü. Elektroforezden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için blotlama yapıldı. Blotlama işlemi 120V 350mA'de 1 saat boyunca +4°C'de

gerçekleştirildi. Proteinlerin nitrosellüloz membrana (Hybond ECL Blotting Membran, Nitrocellulose, Amersham Katalog No: RPN203D) transferinden sonra, Ponceau S (Sigma Katalog No:P-7170) boyaması yapılarak proteinlerin membrana transfer olup olmadığı kontrol edildi. Ponceau membrandan uzaklaşmaya kadar pH'sı 7.4 olan, %0,1 Tween-20 (Merck, Katalog No: 8.22184.0500) ilaveli Tris Buffer Solusyonu (TBS-T) ile yıkama yapıldı. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısısında TBS-T ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran, dilüe edilmiş LC3 (dilüsyon oranı 1/2500), Beklin-1 (dilüsyon oranı 1/10000) ve p62 (dilüsyon oranı 1/8000) antikorları ile +4°C'de shaker üzerinde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran, TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Membran, keçi anti-tavşan sekonder antikorla (dilüsyon oranı 1/2000) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Ardından SuperSignal Chemiluminisans (SuperSignal®WestPicoChemiluminescent Substrate, Pierce, Katalog No: 34080T) ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip, membran Azure Biosystems c280 cihazında değerlendirildi. Western Blot sonuçlarından elde edilen verilen ImageJ yardımıyla sayısal verilere döküldü. Ardından bütün parametreler, β -aktinden elde edilen verilere bölündü. Elde edilen sonuçlar kontrole göre normalize edilerek kontrol değeri "1" birim olarak kabul edildi ve diğer gruplar kontrol grubunun sahip olduğu "1" değerine göre hesaplandı.

3.4. Gerçek Zamanlı PCR

Kontrol ve deney gruplarına ait HUVEC hücre örneklerinden total RNA izolasyonu, Trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen RNA (1-3 μ g), cDNA sentezi için kullanıldı. Revers transkripsiyon reaksiyonu, cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan cDNA'lar kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı. Kantitatif gerçek-zamanlı PCR deneyleri, SYBR Green PCR Kit kullanılarak yapıldı. LC3, Beklin-1 ve p62 oligonükleotid primerleri, sekansları temel alınarak gen bankasından seçildi. Primer sekansları Tablo 3.1'de belirtilmiştir (Tablo 3.1). Gen ekspresyon düzeyleri, internal standart gen kullanılarak normalize edildi.

Tablo 3.1: Real-Time PCR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları ve baz büyüklükleri

Hedef Gen	Sekans	Fragment Büyüklüğü (bp)
LC3	forward 5'- GCTTCCGAGTTGCTGACTGA -3' reverse 5'- TGTACCTCCTTACAGCGGTC -3'	138
BECN1	forward 5'- GAGGTTGAGAAAGGCGAGACA -3' reverse 5'- GGTTTTGATGGAATAGGAGCCG -3'	108
p62	forward 5'- GCCTTGTACCCACATCTCCC -3' reverse 5'- CCGCTCCGATGTCATAGTTCT -3'	139
GAPDH	forward 5'- GCCGCATCTTCTTTTGCGTC -3' reverse 5'- AATCCGTTGACTCCGACCTT -3'	80

3.5. İstatistik

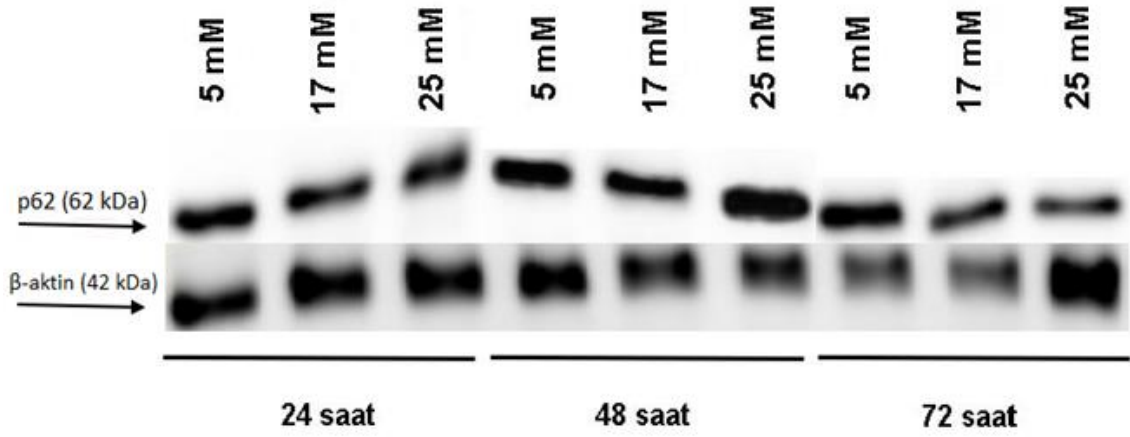
Bütün deneyler üç kez tekrarlanarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism programı ile gerçekleştirildi. Western blot analizlerinden elde edilen verilere önce Two-Way ANOVA testi, ardından Bonferroni'nin post-hoc testi uygulanarak gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Elde edilen PCR verilerinin analizi ise; ilk olarak nonparametrik Kruskal Wallis testinin ardından Dunn'ın Çoklu Karşılaştırma testi uygulanarak sonuçlar değerlendirildi. Bütün veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak sunuldu.

BULGULAR

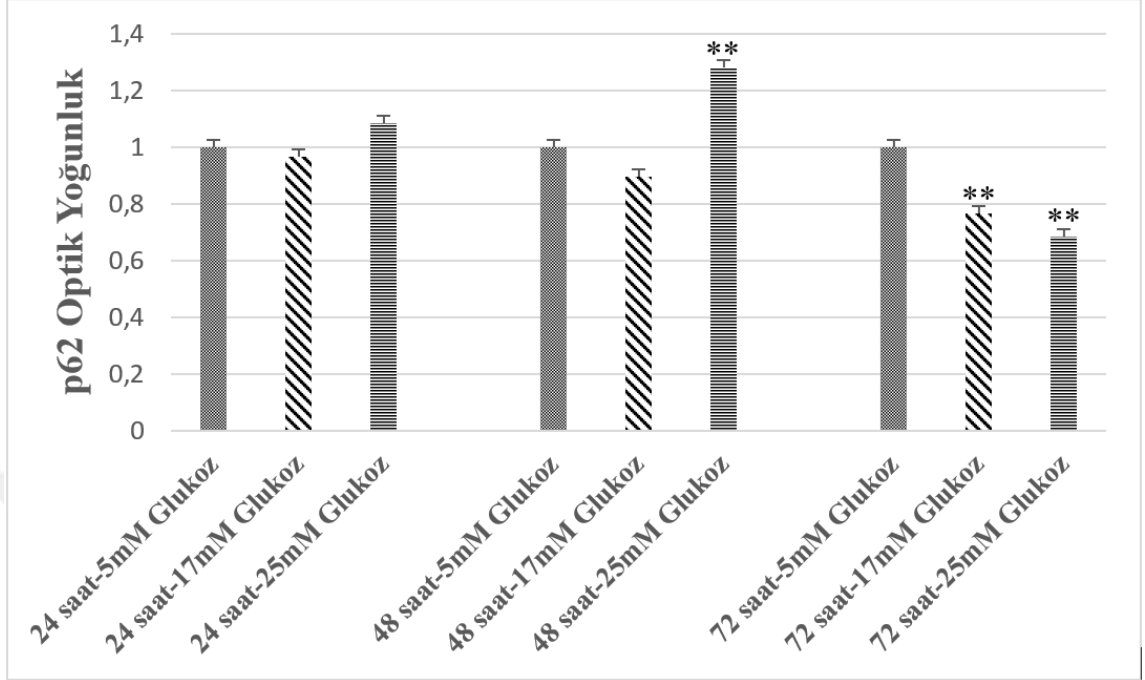
4.1. Western Blot Bulguları

4.1.1. p62 Bulguları

İlk 24 saatte hiperglisemik ve kontrol grupları arasında p62 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). 24 saat-25 mM Glukoz grubunda p62 miktarında bir artış gözlenirse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). p62 miktarında, 48 saat-25 mM Glukoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p>0,05$). 48 saat-17 mM Glukoz grubunda ise bir azalma gözlemlendi ancak bu azalma anlamlı değildi ($p>0,05$). Buna karşın 48 ve 72 saat hiperglisemik gruplarında p62 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p\leq 0,01$) (Şekil 4.2).



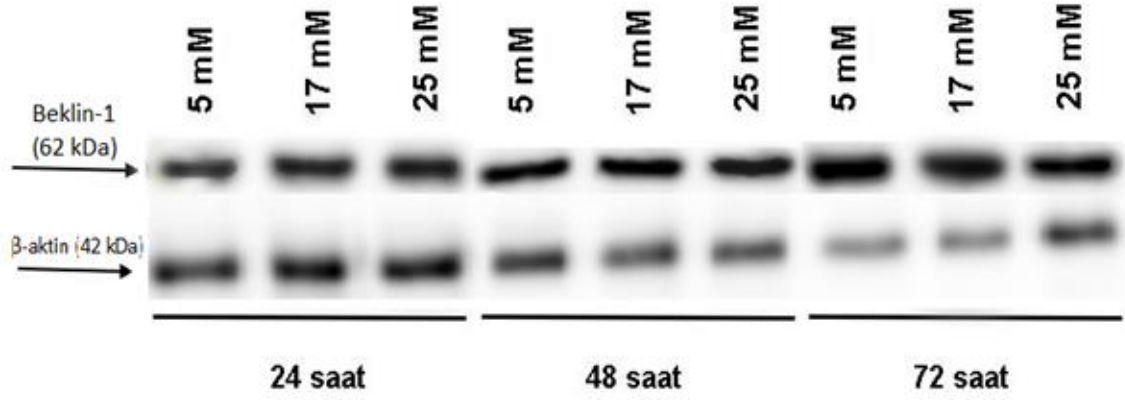
Şekil 4.1: p62 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.



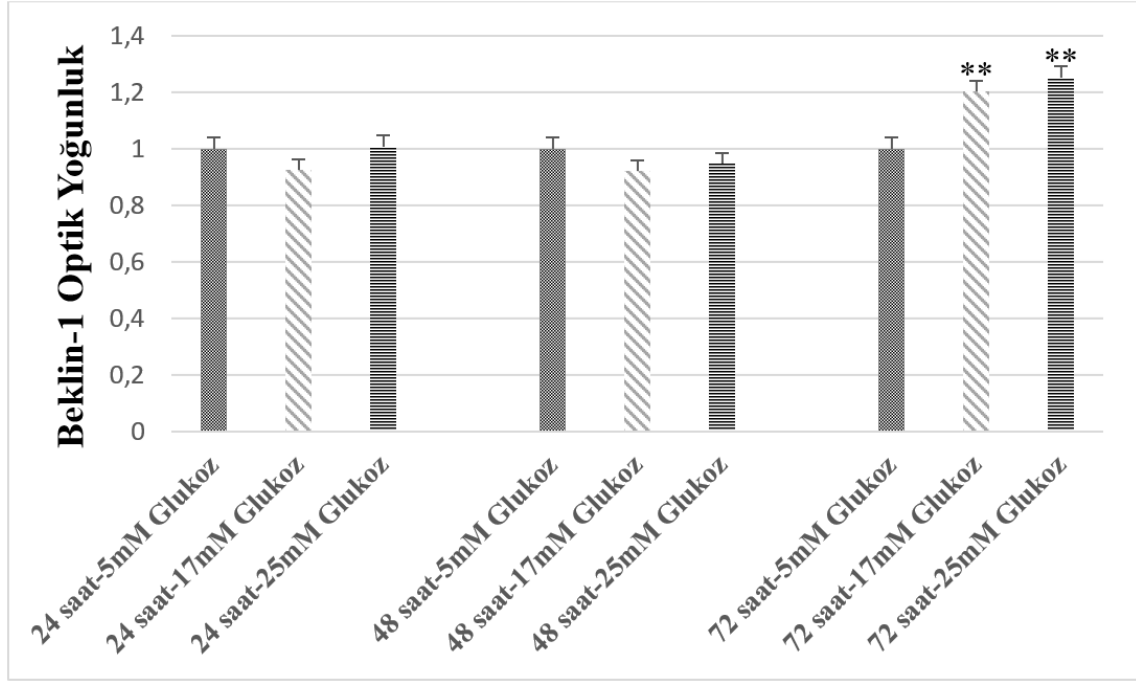
Şekil 4.2: p62 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi (** $p \leq 0,01$).

4.1.2. Beklin-1 Bulguları

24 saat ve 48 saatlik gruplarda Beklin-1 miktarlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0,05$). 24 saat-17 mM Glukoz grubunda ve 48 saat hiperglisemik gruplarda kontrole kıyasla bir azalma tespit edildi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). 72 saatlik hiperglisemik gruplarda ise Beklin-1 miktarında, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p \leq 0,01$) (Şekil 4.4).



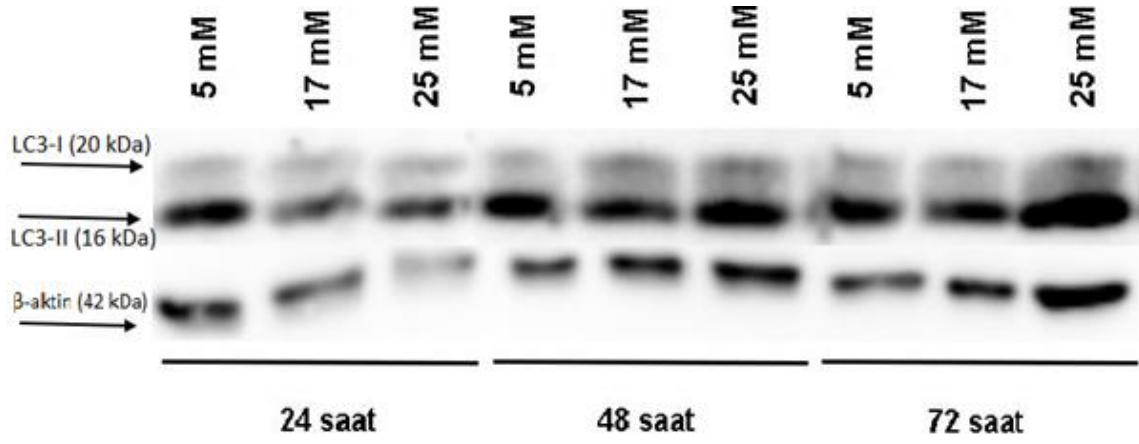
Şekil 4.3: Beklin-1 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.



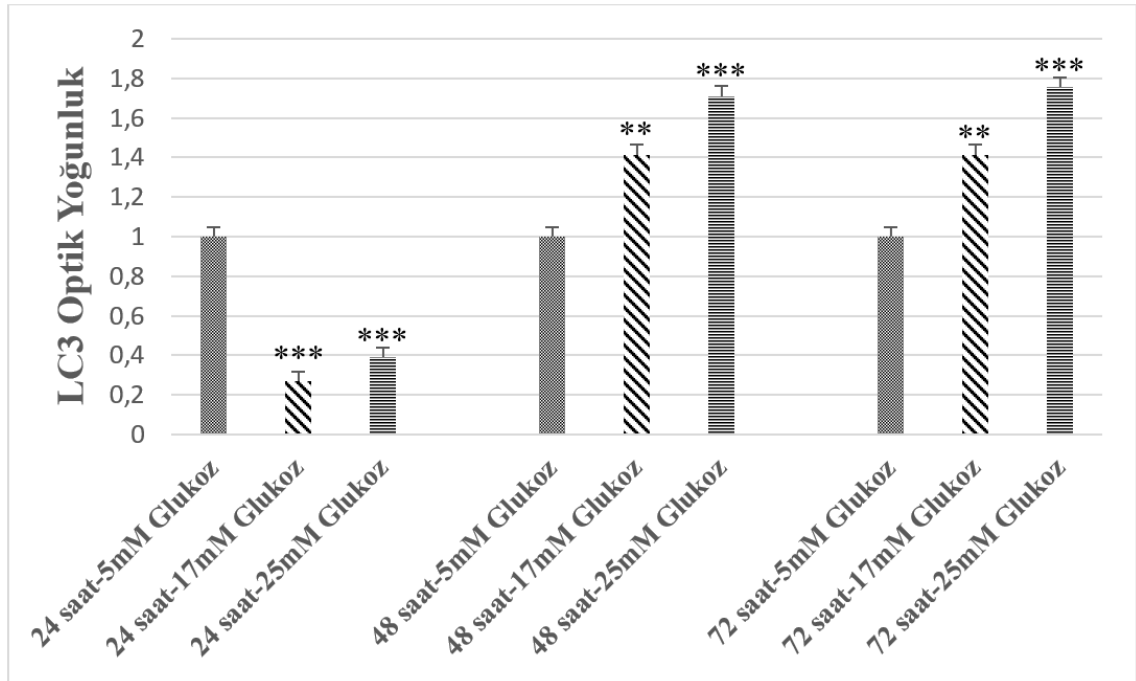
Şekil 4.4: Beklin-1 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi (**p<0,01).

4.1.3. LC3 Bulguları

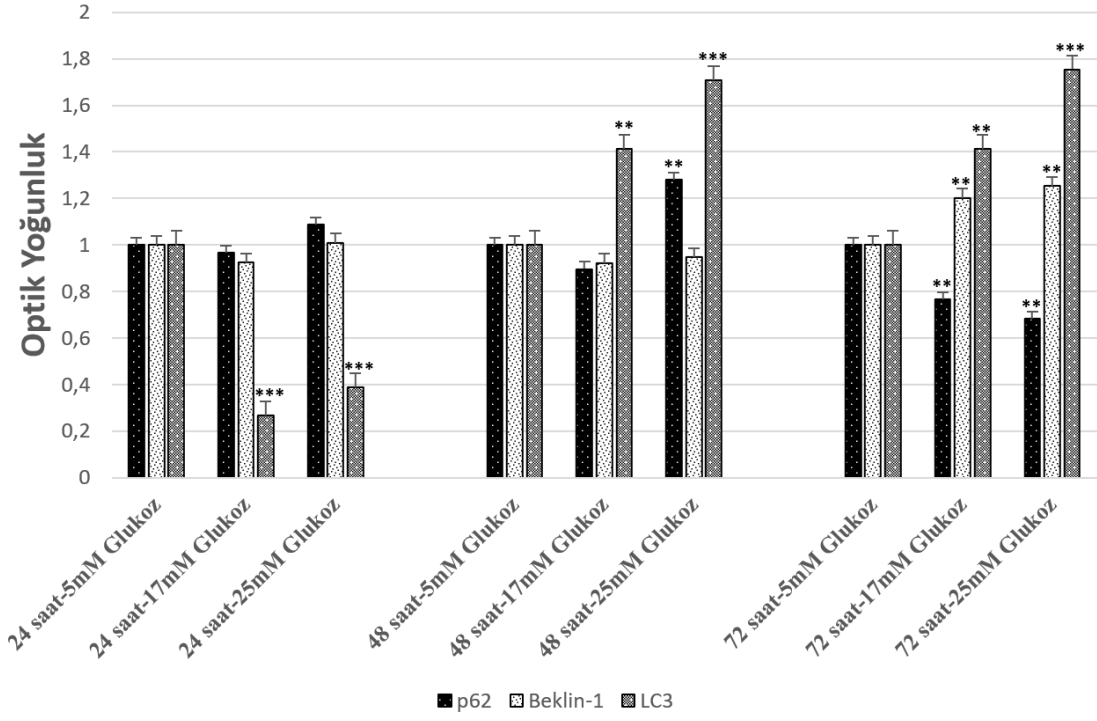
LC3 protein miktarında ilk 24 saatte hiperglisemik gruplarda, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma belirlendi ($p \leq 0,001$). Buna karşın, 48 ve 72 saatlik hiperglisemik gruplarda ise, kontrole kıyasla anlamlı bir artış tespit edildi (48 saat ve 72 saat 17 mM Glukoz grupları için $p \leq 0,01$; 48 ve 72 saat 25 mM Glukoz grupları için $p \leq 0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: LC3 miktarının normoglisemik (kontrol) ve hiperglisemik gruplarda zamana bağlı Western Blot sonucu.



Şekil 4.6: LC3 protein miktarının glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

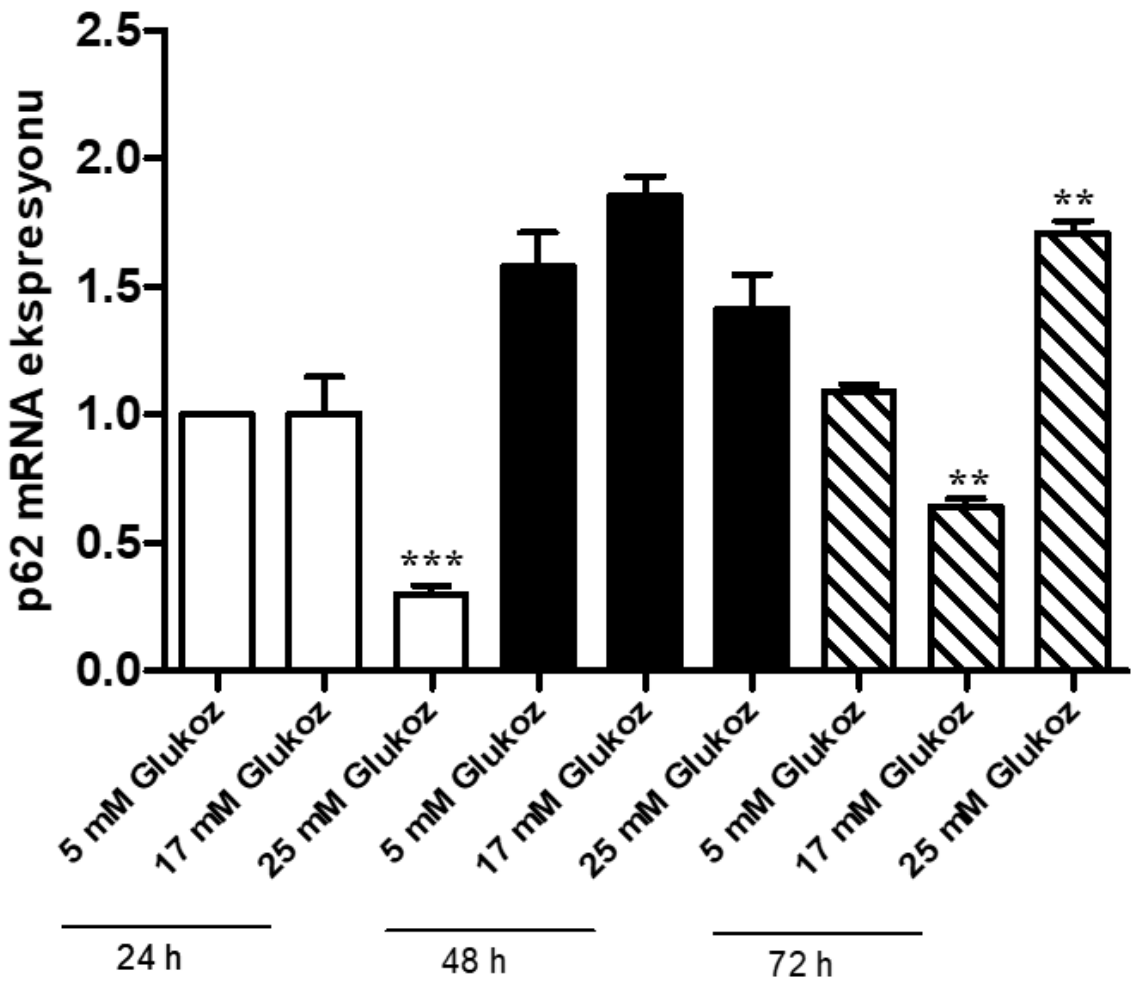


Şekil 4.7: Otofaji belirteçlerinin glukoz konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak bütün gruplar arasında karşılaştırılması (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

4.2. Gerçek Zamanlı PCR Bulguları

4.2.1. p62 Bulguları

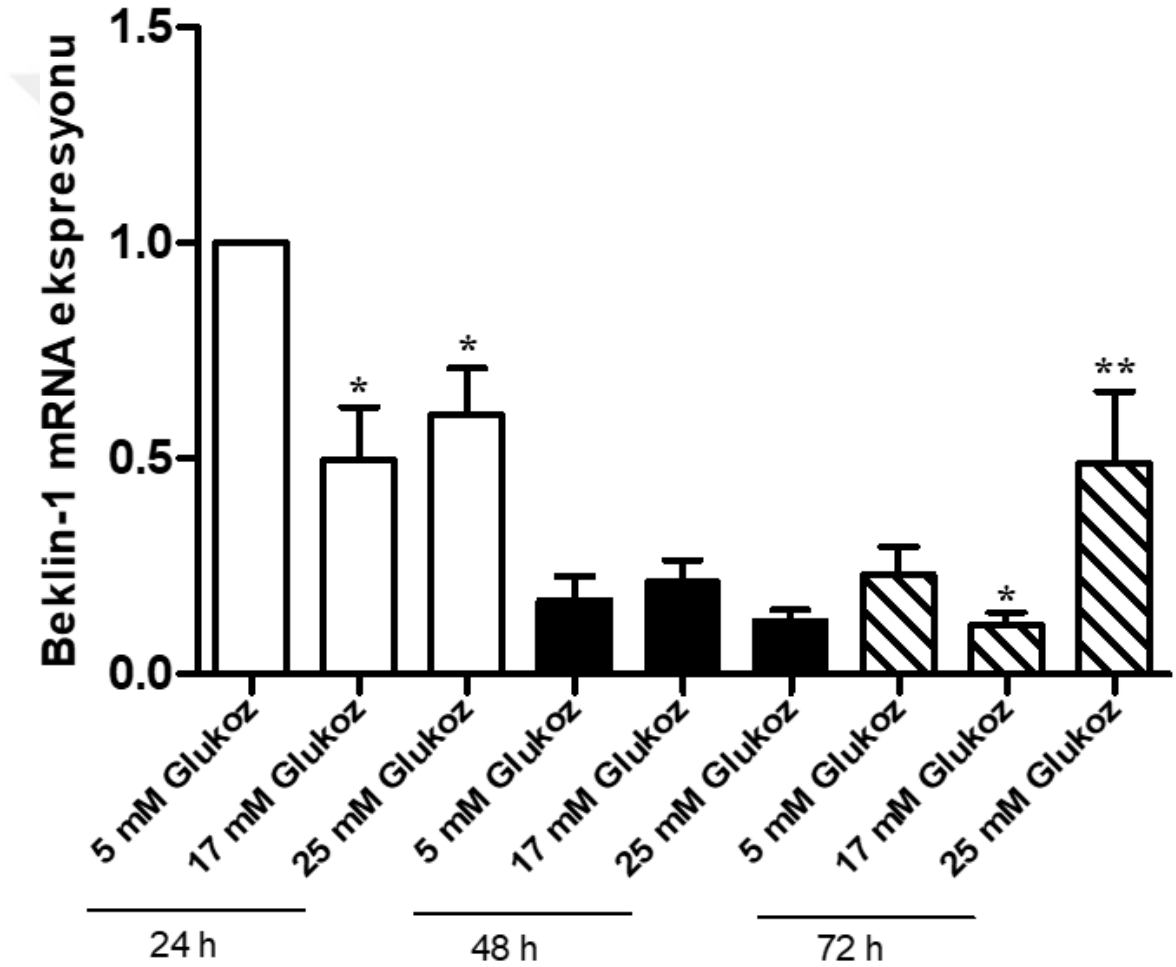
24 saat-25 mM Glukoz grubunda p62 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi ($p \leq 0,001$). 48 saat-17 mM Glukoz grubunda p62 gen ekspresyonunda bir artış ve 48 saat-25 mM Glukoz grubunda p62 gen ekspresyonunda bir azalma gözlemlendi ancak bu değişimler anlamlı değildi ($p > 0,05$). 72 saat-17 mM Glukoz grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi ($**p \leq 0,01$). Buna karşın, 72 saat-25 mM Glukoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p \leq 0,01$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: p62 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi ($**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$).

4.2.2. Beklin-1 Bulguları

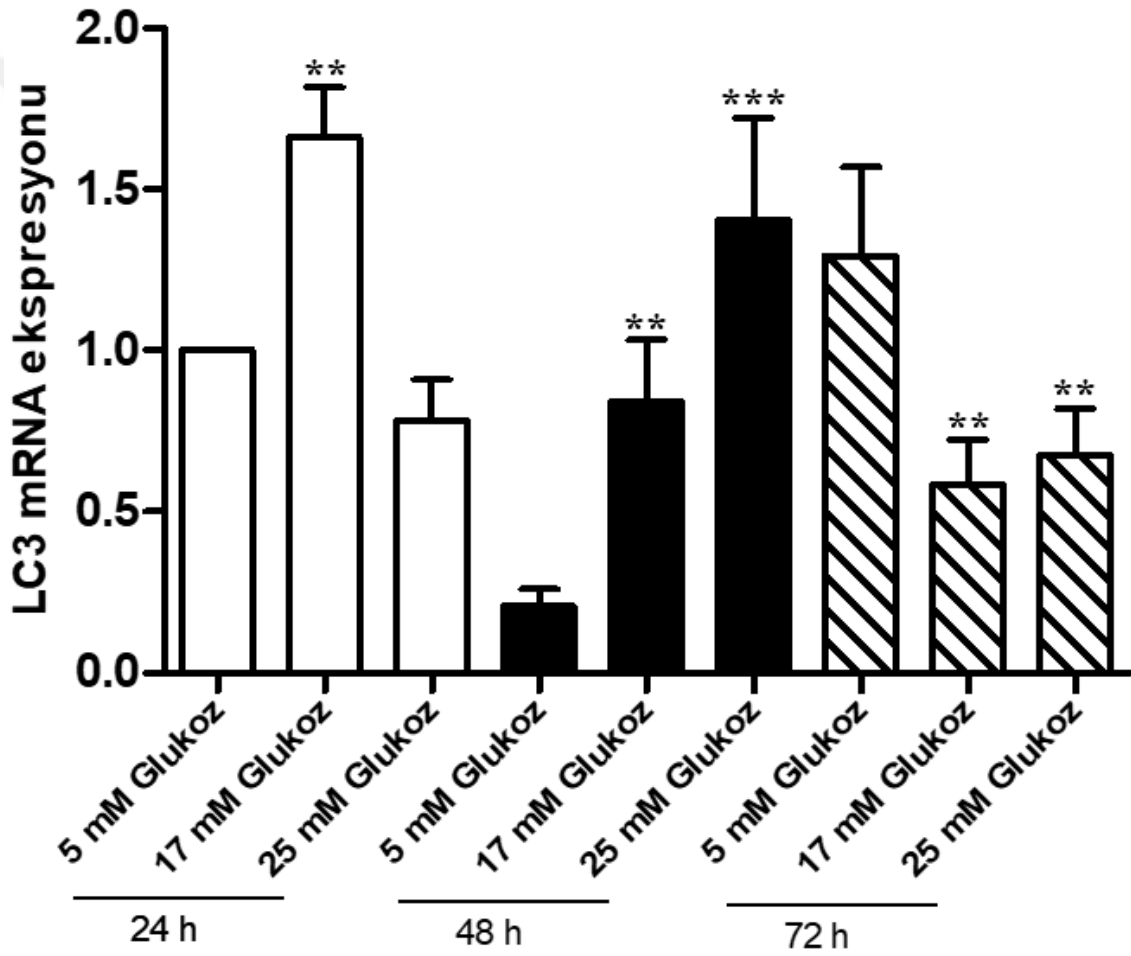
24 saat-17 mM ve 25 mM Glukoz gruplarında Beklin-1 gen ekspresyonunun, kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0,05$). 48 saatlik gruplarda Beklin-1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0,05$). 72 saat-17 mM Glukoz grubunun Beklin-1 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi ($p \leq 0,05$). Buna karşın, 72 saat-25 mM Glukoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p \leq 0,01$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Beklin-1 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

4.2.3. LC3 Bulguları

24 saat-17 mM Glukoz grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir artış tespit edildi ($p \leq 0,01$) ancak 25 mM Glukoz grubunda hafif bir azalma gözlemlense de bu azalma anlamlı değildi ($p > 0,05$). 48 saatlik hiperglisemik gruplarda, kontrole kıyasla anlamlı bir artış tespit edildi (48 saat-17 mM Glukoz grubu için $p \leq 0,01$; 48 saat-25 mM Glukoz grupları için $p \leq 0,001$) Buna karşın 48 saatlik hiperglisemik gruplarda, kontrole kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi ($p \leq 0,01$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: LC3 gen ekspresyonunun glukoz miktarına ve zamana bağlı değişimi (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

TARTIŞMA

Diyabet, dünya üzerinde 400 milyondan fazla prevalansa sahip, metabolik ve otoimmün bir hastalıktır (Chen ve ark., 2011; Whiting ve ark., 2011). Diyabette görülen vasküler komplikasyonlar, bu hastalığın mortalitesini oldukça arttırmaktadır (Grundy ve ark., 2002). Gestasyonel diyabet ise, gebelikte ortaya çıkan bir diyabet tipidir (American Diabetes, 2000). Gebe kadınların %3 ila %30'unda gestasyonel diyabet görülmektedir (American Diabetes, 2011). Gestasyonel diyabet, diğer gebelik hastalıklarının insidansını da arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda gestasyonel diyabet hastası gebelerde preeklampsi insidansının, normal gebelere göre fazla olduğu görülmüştür (Y. Yu ve ark., 2009; Li, Tan, ve ark., 2016).

Plasenta, fetüsün düzgün gelişimi için besin temini, gaz değişimi ve atıkların giderilmesi amacıyla özelleşmiş bir organdır. Normal gestasyonda, trofoblastların desiduaya invazyonu ve desidual damarların remodellenmesi gerekmektedir. Ancak preeklampsi ve gestasyonel diyabette bu invazyon antianjiyogenik faktörler (Redman ve Sargent, 2005) ve pro-inflamatuvar ortamın (Bowen ve ark., 2005), trofoblast invazyonunu ve migrasyonunu kısıtlaması yüzünden düzgün gerçekleşmemektedir (Cawyer ve ark., 2014; Han ve ark., 2015).

Otofaji ökaryotik hücrelerde hayatta kalım, farklılaşma, gelişim ve homeostaz için gereklidir (Levine ve Kroemer, 2008). Otofajinin genel işleyişinde yıkılacak proteinler ubiquitlenerek işaretlenir ve otofagozomlara alınarak yıkım gerçekleştirilir. Otofajinin plasental gelişim için de önemli olduğu bilinmektedir. Ekstravillöz trofoblastların desiduaya invazyonuna katkıda bulunmakla beraber, farklı gebelik aşamalarında gebeliğin devamı için koruyucu etkileri de bulunmaktadır (Signorelli ve ark., 2011; Chifenti ve ark., 2013). Ancak yine de gestasyonel diyabette otofajinin rollerine dair yeterli bilgi literatürde bulunmamaktadır.

Literatürde, hipergliseminin otofajiye olan etkisini inceleyen çalışmalarda bir bütünlük bulunmamaktadır. Hiperglisemik koşulların endotel hücrelerindeki otofajiyi indüklediğini veya baskıladığını bildiren çalışma sayısı oldukça fazladır. Örneğin, endotel progenitör

hücreleri ile yapılan bir çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonlarının otofajiyi baskıladığı bildirilmiştir (D. Tian ve ark., 2020). Ayrıca diyabetik hastalardan izole edilen endotel hücrelerinde de p62 miktarının arttığı, p62 miktarının artmasının otofajiyi baskıladığı raporlanmıştır (Fetterman ve ark., 2016). Benzer sonuçlar fare endotel hücrelerinde (Xie ve ark., 2016) ve sığır aortik endotel hücrelerinde de gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Ancak, endotel progenitor hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise, yüksek glukoz muamelesinin, otofajiyi indüklediği bildirilmiştir (K. A. Kim ve ark., 2014). Hiperglisemik koşulların otofajiyi indüklediğine dair bilgiler farklı deney modelleri kullanılarak gösterilmiştir. Metilglioksal ile yapılan çalışmalarda MGO'nun otofajiyi indüklediği, ancak otofajinin indüklenmesinin endotel hücrelerinin anjiyogenez kapasitesini ve hücrelerdeki VEGFR2 miktarını azalttığı bildirilmiştir (H. Liu ve ark., 2012; Lee ve ark., 2020). Dolayısıyla otofajinin hem endotel hücrelerdeki değişimi hem de bu değişimin hücreyi nasıl etkilediği tartışmalı bir konudur.

Çalışmamızda, maternal-fetal kan akışını sağlayan göbek kordonunda bulunan ven endotel hücrelerinde, hiperglisemik koşullarda otofajinin nasıl etkilendiğini araştırdık. Bunun için otofajinin başlangıç aşamasında kritik rol oynayan Beklin-1, otofagozom ve otofagolizozom oluşumunda rol oynayan LC3 ve selektif otofajinin temel proteini olan p62'nin hiperglisemik koşullarda nasıl değiştiğini protein ve gen analizleriyle belirledik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre p62 miktarı 48 saatlik 25-mM-Glukoz grubunda anlamlı olarak artmış, ancak 72 saatlik 25-mM-Glukoz grubunda ise anlamlı olarak azalmıştır. Hiperglisemik koşullarda p62 ekspresyonunu araştıran diğer çalışmalarda, p62 miktarının glukoz miktarına bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde arttığı ve bu artışın otofaji mekanizmasını bozduğu bildirilmiştir (Fetterman ve ark., 2016). p62 normal otofaji mekanizmasında otofagozom içerisinde işaretlenmiş proteinler ile birlikte yıkılır ve p62 birikimi önlenir (Bjorkoy ve ark., 2009). Dolayısıyla bizim çalışmamızda 48 saatlik 25-mM-Glukoz grubunda görülen p62 artışı da p62 birikimi nedeniyle olabilir. Ancak bir diğer otofaji belirteci olan LC3 miktarının da bu grupta anlamlı olarak artması, bu gruptaki p62 artışının birikime bağlı olarak değil de otofajinin artmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 48 saatlik 25-mM-Glukoz grubundaki p62 gen ekspresyonu, gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. 72 saat sonunda 25-

mM-Glukoz grubunda p62 gen ekspresyonu anlamlı olarak artsa da protein seviyesi anlamlı olarak azalmıştır. Aynı grupta LC3 ve Beklin-1 protein miktarının artması da p62 bulgularımızı desteklemektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda bulgularımız literatür ile benzerlik göstermektedir.

24 saatlik hiperglisemik gruplarda LC3 miktarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Literatürde yüksek glukoz konsantrasyonlarının LC3 ekspresyonunda azalmaya yol açtığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Kobayashi ve ark., 2012; Fetterman ve ark., 2016). Aynı gruplarda p62 miktarının artması, LC3 ekspresyonunda azalmaya yol açmış ve dolayısıyla otofajinin bozulmasına yol açmış olabilir. Biz de çalışmamızda LC3 ekspresyonundaki azalmaya ek olarak, p62 miktarında hafif bir artış tespit ettik. Dolayısıyla ilk 24 saatteki p62 birikimi, LC3 ekspresyonundaki azalmayı açıklayabilir.

24 ve 48 saatlik gruplarda Beklin-1 miktarı, kontrol ile benzerlik göstermiştir. Beklin-1 otofajinin başlangıç aşamasında önemli rol oynayan bir proteindir. Dolayısıyla 24 saatlik hiperglisemik gruplarda gözlenen LC3 ekspresyonundaki azalma, muhtemelen otofajinin elongasyon ya da otofagozom oluşum aşamalarında meydana gelen bir problem ile ilişkili olabilir. Beklin-1 gen ekspresyonunun 24 saatlik hiperglisemik gruplarda kontrole kıyasla anlamlı olarak azalmasına rağmen, protein miktarının değişmemesi de bu öneriyi desteklemektedir. Ancak bunu daha iyi anlayabilmek için elongasyon aşamasında kritik rollere sahip ATG12 ve ATG7 proteinlerinin incelenmesi önemlidir (Yuan ve ark., 1999; Geng ve Klionsky, 2008).

Çalışmamızda, 72 saat sonunda hiperglisemik gruplarda LC3 ve Beklin-1 miktarının kontrole göre anlamlı olarak arttığını, buna karşın p62 miktarının anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. İlginç olarak LC3 gen ekspresyonunun 72 saatlik hiperglisemik gruplarda kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığını gördük. Aynı şekilde 72 saat 25-mM-Glukoz grubundaki p62 gen ekspresyonunun kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığını belirledik. Ancak LC3 protein miktarının bu gruplarda anlamlı olarak artması ve p62 miktarının anlamlı olarak azalması, gen ekspresyonlarındaki değişikliklere rağmen otofajik aktivitenin arttığını göstermektedir. Dolayısıyla 72 saat sonunda hücrelerde otofajinin arttığını söylemek mümkündür. Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada endotel hücreleri yüksek glukoz konsantrasyonlarında 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve bunun

sonucunda otofaji belirteçleri olan LC3 ve Beklin-1 seviyelerinin arttığı, buna karşın p62 miktarının azaldığı bildirilmiştir (Y. X. Xu ve ark., 2018). Aynı çalışmada ilginç olarak, yüksek glukoz konsantrasyonlarında hücre canlılığının arttığı da bildirilmiştir. Bizim çalışmamız da literatür ile uyusmaktadır. Otofajinin yüksek glukoz konsantrasyonlarında inkübe edilen HUVEC hücrelerinde indüklenmesi, otofajinin hücreler üzerinde koruyucu bir etkisinin olabileceğini desteklemektedir.

Otofajinin hiperglisemik hasara karşı koruyucu etkilerini destekleyen çalışmalar literatürde mevcuttur. Fetterman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, insan aort endotel hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada hiperglisemik koşullarda otofajinin azaldığı bildirilmiştir. Ancak spermidin uygulamasından sonra otofajik aktivitenin normale yaklaştığı ve endotel hasarının azaldığı tespit edilmiştir (Fetterman ve ark., 2016). Liang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da endotel hücrelerinde hiperglisemik koşulların otofajiyi inhibe ettiği, ancak amelopsin uygulamasından sonra otofaji aktivitesinin normale yaklaştığı ve hücrelerin oksidatif hasara karşı korunduğu gösterilmiştir (X. Liang ve ark., 2015). Ido ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise otofaji indüksiyonunun hücreleri hiperglisemi ile indüklenen apoptoza karşı koruduğu bildirilmiştir (Ido ve ark., 2002). Literatürdeki bu çalışmalara bakıldığında hiperglisemik koşullarda endotel hücrelerinde otofaji inhibisyonu gerçekleştiği, ancak otofajinin restorasyonu ile endotel hücre hasarının azaldığını söylemek mümkündür. Biz ise sadece ilk 24 saatte otofajide bir azalma tespit ettik. Ayrıca hücre canlılığını ölçmek için spesifik bir deney gerçekleştirmedik. Dolayısıyla otofajinin ilk 24 saatte azalması da hücreyi korumak amaçlı olmuş olabilir. Ancak bunun kesin olarak söylenebilmesi için hücre canlılık testlerinin uygulanmış olması gerekmektedir. Genel olarak literatürde hipergliseminin endotel hücrelerindeki otofaji üzerindeki etkisi tartışmalı olduğundan, bulgularımız literatür ile kısmen örtüşmektedir.

Buna karşın, hiperglisemik koşullarda otofajinin baskılanmasının da hücrede koruyucu etki gösterdiğini bildiren çokça çalışma bulunmaktadır. Kobayashi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, hiperglisemik koşullarda kardiyomiyositlerde otofajinin indüklendiği ve kardiyomiyosit hasarının arttığı, ancak otofajinin inhibisyonu sonucunda hücre hasarının azaldığı bildirilmiştir (Kobayashi ve ark., 2012). Niu ve arkadaşlarının

yaptığı bir çalışmada ise hiperglisemik koşullarda inkübe edilen endotel hücrelerinde otofajinin ve endotel hasarının arttığı, ancak metformin uygulamasından sonra otofajinin downregüle olduğu ve endotel hasarının azaldığı gösterilmiştir (Niu ve ark., 2019). Dolayısıyla otofajinin hücre tipine göre koruyucu etki gösterdiğini de söylemek mümkündür.

Çalışmamızda, hiperglisemik koşullarda endotel hücrelerinde otofajinin ilk 24 saatte anlamlı olarak azaldığını, ancak zaman ilerledikçe arttığını tespit ettik. İlk 24 saatte otofajinin azalmasının iki sebebi olabilir: birincisi p62 birikimi dolayısıyla otofajinin inhibe edilmesi, ikincisi ise hücrelerin bir anda yüksek glukoz miktarına maruz kalması sonucu kendini korumaya çalışması sonucu otofajinin azalması. Ancak çalışmamızda hücre canlılığı ya da sayısıyla alakalı deney gerçekleştirmedik. Otofajinin hücreler üzerindeki olası koruyucu etkilerini anlayabilmek için hücre sayısı ve canlılığıyla alakalı ek çalışmalar yapılmalıdır.

Yapmış olduğumuz araştırmaların sonucunda otofajinin hiperglisemik koşullarda ilk 24 saatte azaldığı, ancak hiperglisemi maruz süresinin artışına ve doza bağlı olarak arttığını tespit ettik. Bulgularımız, literatürdeki tartışmalı bilgilerden ötürü kısmen literatür ile örtüşmektedir. Otofajinin etkilerinin daha iyi anlaşılması için otofaji inhibitörlerinin kullanılması, bu konunun daha net anlaşılmasına yardımcı olabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada hiperglisemik koşulların endotel hücrelerindeki otofajiye olan etkisi incelendi. Bunun için 5-mM, 17-mM ve 25-mM glukoz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde hücreler 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücrelerdeki otofajinin nasıl etkilendiğini ölçmek için otofaji belirteçleri olan p62, LC3 ve Beklin-1 miktarları, Western Blot ve PCR analizleri ile gruplar arasında karşılaştırıldı.

Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- 1- p62 protein miktarı ilk 24 saatte hiperglisemik koşullardan etkilenmemiştir. p62 gen ekspresyonu 24 saat 25-mM-Glukoz grubunda anlamlı olarak azalsa da bu azalma protein seviyesinde yansımamıştır. Ancak 25-mM glukoz konsantrasyonunda 48 saat sonrasında p62 miktarı anlamlı ölçüde artmıştır. 72 saat sonra ise p62 gen ekspresyonu 25-mM-Glukoz grubunda anlamlı olarak artsa da p62 miktarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.
- 2- Beklin-1 protein miktarı için 24 ve 48 saatlik gruplarda bir farklılık tespit edilmemiştir. Buna karşın, 72 saatlik hiperglisemik gruplarda anlamlı derecede artmıştır. Beklin-1 gen ekspresyonu 24 saatlik hiperglisemik gruplarda anlamlı olarak azalmıştır, ancak gen ekspresyonundaki azalma protein seviyesine yansımamıştır.
- 3- LC3 protein miktarı ilk 24 saatte tüm hiperglisemik gruplarda anlamlı şekilde azalmıştır. Ancak 48 ve 72 saat hiperglisemik gruplarda anlamlı ölçüde artmıştır. 72 saat hiperglisemik gruplarında LC3 gen ekspresyonunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülmüştür. Buna rağmen LC3 protein miktarı bu gruplarda kontrole kıyasla anlamlı olarak artmıştır.
- 4- Yüksek glukoz miktarı ilk 24 saatte otofajiye inhibe etmiştir. LC3 protein miktarının azalmasına rağmen, Beklin-1 protein miktarında değişim görülmemesi otofajinin normal şekilde başladığını ancak elongasyon aşamasında inhibe edildiğini göstermektedir.

- 5- Yüksek glukoz konsantrasyonları, ilk 24 saatte hücreler üzerinde otofajiye inhibe edici bir etki gösterse de ilerleyen zamanla birlikte inkübasyon süresinin artması sonucu otofajinin indüklenmesine sebep olmuştur.

Yüksek glukoz konsantrasyonunun HUVEC’lerdeki otofaji etkisi, zamana bağlı olarak değişim göstermektedir. Otofajiye olan bu etkinin nedeninin araştırılması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Aird, W. C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (7): 1392-1406.
- Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2 (1): a006429.
- Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., . . . Levine, B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999; 59 (1): 59-65.
- Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. Role of ampk-mtor-ulk1/2 in the regulation of autophagy: Cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012; 32 (1): 2-11.
- American Diabetes, A. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2000; 23 Suppl 1: S77-79.
- American Diabetes, A. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011; 34 Suppl 1: S11-61.
- Arslan, D. K., G.; Gözüaık, D. Otofaji: Bir hücresele stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2011; 2 (4).
- Baergen, K. B. G. J. B. N. (2012). Early development of the human placenta. In *Pathology of the human placenta* (pp. 41-53). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Birgisdottir, A. B., Lamark, T., & Johansen, T. The ltr motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci.* 2013; 126 (Pt 15): 3237-3247.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. P62/sqstm1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005; 171 (4): 603-614.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. Monitoring autophagic degradation of p62/sqstm1. *Methods Enzymol.* 2009; 452: 181-197.
- Bowen, R. S., Gu, Y., Zhang, Y., Lewis, D. F., & Wang, Y. Hypoxia promotes interleukin-6 and -8 but reduces interleukin-10 production by placental trophoblast cells from preeclamptic pregnancies. *J Soc Gynecol Investig.* 2005; 12 (6): 428-432.
- Boyd, J. D. a. H., W. J. The human placenta: Cambridge [England] Heffer; 1970, p:
- Brooks, C., Wei, Q., Cho, S. G., & Dong, Z. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J Clin Invest.* 2009; 119 (5): 1275-1285.
- Bucala, R., Tracey, K. J., & Cerami, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991; 87 (2): 432-438.
- Bucala, R., & Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26 (6): 875-888.
- Burgos-Moron, E., Abad-Jimenez, Z., Maranon, A. M., Iannantuoni, F., Escribano-Lopez, I., Lopez-Domenech, S., . . . Victor, V. M. Relationship between oxidative stress, er stress, and inflammation in type 2 diabetes: The battle continues. *J Clin Med.* 2019; 8 (9).
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 2010; 584 (7): 1302-1312.
- Cai, S., Khoo, J., & Channon, K. M. Augmented bh4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2005; 65 (4): 823-831.
- Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75: 685-705.
- Casey, B. M., Lucas, M. J., McIntire, D. D., & Leveno, K. J. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. *Obstet Gynecol.* 1997; 90 (6): 869-873.

- Cawyer, C. R., Horvat, D., Leonard, D., Allen, S. R., Jones, R. O., Zawieja, D. C., . . . Uddin, M. N. Hyperglycemia impairs cytotrophoblast function via stress signaling. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 211 (5): 541 e541-548.
- Cervar, M., Kainer, F., Jones, C. J., & Desoye, G. Altered release of endothelin-1,2 and thromboxane b2 from trophoblastic cells in pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest.* 1996; 26 (1): 30-37.
- Chan, W. H., & Wu, H. J. Methylglyoxal and high glucose co-treatment induces apoptosis or necrosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2008; 103 (4): 1144-1157.
- Charnock-Jones, D. S., Kaufmann, P., & Mayhew, T. M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 2004; 25 (2-3): 103-113.
- Charonis, A. S., Reger, L. A., Dege, J. E., Kouzi-Koliakos, K., Furcht, L. T., Wohlhueter, R. M., & Tsilibary, E. C. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes.* 1990; 39 (7): 807-814.
- Chau, Y. P., Lin, S. Y., Chen, J. H., & Tai, M. H. Endostatin induces autophagic cell death in eahy926 human endothelial cells. *Histol Histopathol.* 2003; 18 (3): 715-726.
- Chen, L., Magliano, D. J., & Zimmet, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8 (4): 228-236.
- Chifenti, B., Locci, M. T., Lazzeri, G., Guagnozzi, M., Dinucci, D., Chiellini, F., . . . Battini, L. Autophagy-related protein lc3 and beclin-1 in the first trimester of pregnancy. *Clin Exp Reprod Med.* 2013; 40 (1): 33-37.
- Claesson-Welsh, L. Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci.* 2015; 120 (3): 135-143.
- Corman, B., Duriez, M., Poitevin, P., Heudes, D., Bruneval, P., Tedgui, A., & Levy, B. I. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95 (3): 1301-1306.
- Coustan, D. R. Gestational diabetes mellitus. *Clin Chem.* 2013; 59 (9): 1310-1321.
- Daskalaki, I., Gkikas, I., & Tavernarakis, N. Hypoxia and selective autophagy in cancer development and therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2018; 6: 104.
- Datan, E., Shirazian, A., Benjamin, S., Matassov, D., Tinari, A., Malorni, W., . . . Zakeri, Z. Mtor/p70s6k signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza a infection. *Virology.* 2014; 452-453: 175-190.
- de Andrade Ramos, B. R., & Witkin, S. S. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome. *Cell Stress Chaperones.* 2016; 21 (5): 755-762.
- Desoye, G., Korgun, E. T., Ghaffari-Tabrizi, N., & Hahn, T. Is fetal macrosomia in adequately controlled diabetic women the result of a placental defect?--a hypothesis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002; 11 (4): 258-261.
- Devrim Öz Arslan, G. K., Devrim Gözüaçık. Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2011; 2 (4): 11.
- Diez, J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol.* 2007; 44: 76-95.
- Ding, Y., Vaziri, N. D., Coulson, R., Kamanna, V. S., & Roh, D. D. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279 (1): E11-17.
- Domigan, C. K., Warren, C. M., Antanesian, V., Happel, K., Ziyad, S., Lee, S., . . . Iruela-Arispe, M. L. Autocrine vegf maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. *J Cell Sci.* 2015; 128 (12): 2236-2248.
- Dong, Y., Wu, Y., Wu, M., Wang, S., Zhang, J., Xie, Z., . . . Zou, M. H. Activation of protease calpain by oxidized and glycated ldl increases the degradation of endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med.* 2009; 13 (9A): 2899-2910.

- Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., & Brownlee, M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the akt site. *J Clin Invest.* 2001; 108 (9): 1341-1348.
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., . . . Watada, H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008; 8 (4): 325-332.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., . . . Shaw, R. J. Phosphorylation of ulk1 (hatg1) by amp-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011; 331 (6016): 456-461.
- Eriksson, U. J., & Borg, L. A. Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes.* 1993; 42 (3): 411-419.
- Esposito, C., Fasoli, G., Plati, A. R., Bellotti, N., Conte, M. M., Cornacchia, F., . . . Dal Canton, A. Long-term exposure to high glucose up-regulates vcam-induced endothelial cell adhesiveness to pbmc. *Kidney Int.* 2001; 59 (5): 1842-1849.
- Fetterman, J. L., Holbrook, M., Flint, N., Feng, B., Breton-Romero, R., Linder, E. A., . . . Vita, J. A. Restoration of autophagy in endothelial cells from patients with diabetes mellitus improves nitric oxide signaling. *Atherosclerosis.* 2016; 247: 207-217.
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., . . . Simonsen, A. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol.* 2007; 179 (3): 485-500.
- Franses, J. W., Drosu, N. C., Gibson, W. J., Chitalia, V. C., & Edelman, E. R. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int J Cancer.* 2013; 133 (6): 1334-1344.
- Gal, J., Strom, A. L., Kilty, R., Zhang, F., & Zhu, H. P62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2007; 282 (15): 11068-11077.
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 2016; 26 (9): 1021-1032.
- Gelain, D. P., Dalmolin, R. J., Belau, V. L., Moreira, J. C., Klamt, F., & Castro, M. A. A systematic review of human antioxidant genes. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009; 14: 4457-4463.
- Geng, J., & Klionsky, D. J. The atg8 and atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: Beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 2008; 9 (9): 859-864.
- Gero, D. Endothelial dysfunction old concepts and new challenges (H. Lenari Ed.); 2018, p: 179-210.
- Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118 (4): 620-636.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006; 114 (6): 597-605.
- Goldman, S., Zhang, Y., & Jin, S. Autophagy and adipogenesis: Implications in obesity and type ii diabetes. *Autophagy.* 2010; 6 (1): 179-181.
- Grundey, S. M., Howard, B., Smith, S., Jr., Eckel, R., Redberg, R., & Bonow, R. O. Prevention conference vi: Diabetes and cardiovascular disease: Executive summary: Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the american heart association. *Circulation.* 2002; 105 (18): 2231-2239.
- Hadi, H. A., & Suwaidi, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3 (6): 853-876.

- Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M., & Charonis, A. S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type iv collagen. *J Biol Chem.* 1992; 267 (18): 12404-12407.
- Hamuro, M., Polan, J., Natarajan, M., & Mohan, S. High glucose induced nuclear factor kappa b mediated inhibition of endothelial cell migration. *Atherosclerosis.* 2002; 162 (2): 277-287.
- Han, C. S., Herrin, M. A., Pitruzzello, M. C., Mulla, M. J., Werner, E. F., Pettker, C. M., . . . Abrahams, V. M. Glucose and metformin modulate human first trimester trophoblast function: A model and potential therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *Am J Reprod Immunol.* 2015; 73 (4): 362-371.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., . . . Mizushima, N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006; 441 (7095): 885-889.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J. L., & Mizushima, N. Fip200, a ulk-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2008; 181 (3): 497-510.
- Hauser, S., Jung, F., & Pietzsch, J. Human endothelial cell models in biomaterial research. *Trends Biotechnol.* 2017; 35 (3): 265-277.
- He, C., & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 67-93.
- Hegab, Z., Gibbons, S., Neyses, L., & Mamas, M. A. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol.* 2012; 4 (4): 90-102.
- Hertig, A. T., Rock, J., & Adams, E. C. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat.* 1956; 98 (3): 435-493.
- Horio, E., Kadomatsu, T., Miyata, K., Arai, Y., Hosokawa, K., Doi, Y., . . . Oike, Y. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (4): 790-800.
- Huber, T. L., Zhou, Y., Mead, P. E., & Zon, L. I. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood.* 1998; 92 (11): 4128-4137.
- Ido, Y., Carling, D., & Ruderman, N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Inhibition by the amp-activated protein kinase activation. *Diabetes.* 2002; 51 (1): 159-167.
- Inpanathan, S., & Botelho, R. J. The lysosome signaling platform: Adapting with the times. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 113.
- Jacot, J. G., & Wong, J. Y. Endothelial injury induces vascular smooth muscle cell proliferation in highly localized regions of a direct contact co-culture system. *Cell Biochem Biophys.* 2008; 52 (1): 37-46.
- Jaffe, E. A., Hoyer, L. W., & Nachman, R. L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1973; 52 (11): 2757-2764.
- Jaffe, E. A., Hoyer, L. W., & Nachman, R. L. Synthesis of von willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71 (5): 1906-1909.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973; 52 (11): 2745-2756.
- Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9 (6): 685-693.
- John, W. G., Gray, M. R., Bates, D. L., & Beacham, J. L. Enzyme immunoassay--a new technique for estimating hemoglobin a1c. *Clin Chem.* 1993; 39 (4): 663-666.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. Lc3, a mammalian homologue of yeast apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19 (21): 5720-5728.

- Kahn, S. E. The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2000; 108 Suppl 6a: 2S-8S.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011; 18 (4): 571-580.
- Karasu, C. Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: Effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4: 240-256.
- Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., . . . Chaicumpa, W. A comprehensive review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: Current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy. *Cells.* 2019; 8 (7).
- Kim, J. A., Berliner, J. A., Natarajan, R. D., & Nadler, J. L. Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes.* 1994; 43 (9): 1103-1107.
- Kim, K. A., Shin, Y. J., Akram, M., Kim, E. S., Choi, K. W., Suh, H., . . . Bae, O. N. High glucose condition induces autophagy in endothelial progenitor cells contributing to angiogenic impairment. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37 (7): 1248-1252.
- Kim, S. T., Tasaki, T., Zakrzewska, A., Yoo, Y. D., Sa Sung, K., Kim, S. H., . . . Kwon, Y. T. The n-end rule proteolytic system in autophagy. *Autophagy.* 2013; 9 (7): 1100-1103.
- Kim, Y. C., & Guan, K. L. Mtor: A pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest.* 2015; 125 (1): 25-32.
- Klionsky, D. J., Meijer, A. J., & Codogno, P. Autophagy and p70s6 kinase. *Autophagy.* 2005; 1 (1): 59-60; discussion 60-51.
- Kobayashi, S., Xu, X., Chen, K., & Liang, Q. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy.* 2012; 8 (4): 577-592.
- Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Dyszkiewicz-Konwinska, M., Piotrowska-Kempisty, H., . . . Kempisty, B. Human umbilical vein endothelial cells (huvecs) co-culture with osteogenic cells: From molecular communication to engineering prevascularised bone grafts. *J Clin Med.* 2019; 8 (10).
- Koizumi, K., Wang, G., & Park, L. Endothelial dysfunction and amyloid-beta-induced neurovascular alterations. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36 (2): 155-165.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007; 131 (6): 1149-1163.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., . . . Chiba, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005; 169 (3): 425-434.
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell.* 2009; 33 (4): 517-527.
- Kuusisto, E., Kauppinen, T., & Alafuzoff, I. Use of p62/sqstm1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34 (2): 169-180.
- Kuusisto, E., Salminen, A., & Alafuzoff, I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport.* 2001; 12 (10): 2085-2090.
- Laga, M., Cottyn, A., Van Herreweghe, F., Vanden Berghe, W., Haegeman, G., Van Oostveldt, P., . . . Vancompernelle, K. Methylglyoxal suppresses tnfr-alpha-induced nf-kappaB activation by inhibiting nf-kappaB DNA-binding. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74 (4): 579-589.
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007; 100 (6): 782-794.
- Lawrence, R. E., & Zoncu, R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol.* 2019; 21 (2): 133-142.

- Lee, J. H., Parveen, A., Do, M. H., Kang, M. C., Yumnam, S., & Kim, S. Y. Molecular mechanisms of methylglyoxal-induced aortic endothelial dysfunction in human vascular endothelial cells. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (5): 403.
- Levine, B., & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132 (1): 27-42.
- Levine, B., Sinha, S., & Kroemer, G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008; 4 (5): 600-606.
- Li, X., Fang, P., Li, Y., Kuo, Y. M., Andrews, A. J., Nanayakkara, G., . . . Yang, X. Mitochondrial reactive oxygen species mediate lysophosphatidylcholine-induced endothelial cell activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36 (6): 1090-1100.
- Li, X., Tan, H., Huang, X., Zhou, S., Hu, S., Wang, X., . . . Wen, S. W. Similarities and differences between the risk factors for gestational hypertension and preeclampsia: A population based cohort study in south china. *Pregnancy Hypertens.* 2016; 6 (1): 66-71.
- Liang, X., Zhang, T., Shi, L., Kang, C., Wan, J., Zhou, Y., . . . Mi, M. Ampelopsin protects endothelial cells from hyperglycemia-induced oxidative damage by inducing autophagy via the ampk signaling pathway. *Biofactors.* 2015; 41 (6): 463-475.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999; 402 (6762): 672-676.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., . . . Levine, B. Protection against fatal sindbis virus encephalitis by beclin, a novel bcl-2-interacting protein. *J Virol.* 1998; 72 (11): 8586-8596.
- Liu, H., Yu, S., Zhang, H., & Xu, J. Angiogenesis impairment in diabetes: Role of methylglyoxal-induced receptor for advanced glycation endproducts, autophagy and vascular endothelial growth factor receptor 2. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e46720.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8 (8): 627-644.
- Lovejoy, J. C. The influence of dietary fat on insulin resistance. *Curr Diab Rep.* 2002; 2 (5): 435-440.
- Lu, W. H., Shi, Y. X., Ma, Z. L., Wang, G., Liu, L., Chuai, M., . . . Yang, X. Proper autophagy is indispensable for angiogenesis during chick embryo development. *Cell Cycle.* 2016; 15 (13): 1742-1754.
- Ma, G. M., Halayko, A. J., Stelmack, G. L., Zhu, F., Zhao, R., Hillier, C. T., & Shen, G. X. Effects of oxidized and glycated low-density lipoproteins on transcription and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Pathol.* 2006; 15 (1): 3-10.
- Mack, H. I., Zheng, B., Asara, J. M., & Thomas, S. M. Ampk-dependent phosphorylation of ulk1 regulates atg9 localization. *Autophagy.* 2012; 8 (8): 1197-1214.
- Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., & Kroemer, G. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (1): 87-93.
- Mandarino, L. J., Finlayson, J., & Hassell, J. R. High glucose downregulates glucose transport activity in retinal capillary pericytes but not endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35 (3): 964-972.
- Manduteanu, I., Voinea, M., Serban, G., & Simionescu, M. High glucose induces enhanced monocyte adhesion to valvular endothelial cells via a mechanism involving icam-1, vcam-1 and cd18. *Endothelium.* 1999; 6 (4): 315-324.
- Mann, S. S., & Hammarback, J. A. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of map1a and map1b. *J Biol Chem.* 1994; 269 (15): 11492-11497.
- Marom, K., Levy, V., Pillemer, G., & Fainsod, A. Temporal analysis of the early bmp functions identifies distinct anti-organizer and mesoderm patterning phases. *Dev Biol.* 2005; 282 (2): 442-454.

- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., . . . Sandri, M. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* 2009; 10 (6): 507-515.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., . . . Yoshimori, T. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the pi3-kinase complex via atg14l. *J Cell Biol.* 2010; 190 (4): 511-521.
- Meijer, A. J., & Codogno, P. Macroautophagy: Protector in the diabetes drama? *Autophagy.* 2007; 3 (5): 523-526.
- Menon, R., Boldogh, I., Hawkins, H. K., Woodson, M., Poletini, J., Syed, T. A., . . . Taylor, R. N. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* 2014; 184 (6): 1740-1751.
- Menzies, R. A., & Gold, P. H. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem.* 1971; 246 (8): 2425-2429.
- Milliat, F., Francois, A., Isoir, M., Deutsch, E., Tamarat, R., Tarlet, G., . . . Benderitter, M. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: Implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol.* 2006; 169 (4): 1484-1495.
- Mizushima, N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev.* 2007; 21 (22): 2861-2873.
- Morigi, M., Angioletti, S., Imberti, B., Donadelli, R., Micheletti, G., Figliuzzi, M., . . . Remuzzi, G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a nf-kb-dependent fashion. *J Clin Invest.* 1998; 101 (9): 1905-1915.
- Moses, R. G. The recurrence rate of gestational diabetes in subsequent pregnancies. *Diabetes Care.* 1996; 19 (12): 1348-1350.
- Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: Association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem.* 2011; 286 (25): 22426-22440.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., . . . Otsu, K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* 2007; 13 (5): 619-624.
- Nakashima, A., Aoki, A., Kusabiraki, T., Shima, T., Yoshino, O., Cheng, S. B., . . . Saito, S. Role of autophagy in oocytogenesis, embryogenesis, implantation, and pathophysiology of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017; 43 (4): 633-643.
- Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., . . . Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992; 267 (21): 14998-15004.
- Nihira, K., Miki, Y., Ono, K., Suzuki, T., & Sasano, H. An inhibition of p62/sqstm1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2014; 105 (5): 568-575.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., . . . Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000; 404 (6779): 787-790.
- Niu, C., Chen, Z., Kim, K. T., Sun, J., Xue, M., Chen, G., . . . Li, X. Metformin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment by downregulating autophagy via the hedgehog pathway. *Autophagy.* 2019; 15 (5): 843-870.
- Norris, S. L. Health-related quality of life among adults with diabetes. *Curr Diab Rep.* 2005; 5 (2): 124-130.
- Olive, M., van Leeuwen, F. W., Janue, A., Moreno, D., Torrejon-Escribano, B., & Ferrer, I. Expression of mutant ubiquitin (ubb+1) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34 (1): 76-87.
- Paine, M. G., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., & Wooten, M. W. Evidence for p62 aggregate formation: Role in cell survival. *FEBS Lett.* 2005; 579 (22): 5029-5034.

- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. P62/sqstm1 binds directly to atg8/lc3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282 (33): 24131-24145.
- Park, H. J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., & Galper, J. B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* 2006; 2 (2): 93-102.
- Park, J. M., Seo, M., Jung, C. H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N. M., . . . Kim, D. H. Ulk1 phosphorylates ser30 of becn1 in association with atg14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy.* 2018; 14 (4): 584-597.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., . . . Levine, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122 (6): 927-939.
- Piconi, L., Quagliaro, L., Da Ros, R., Assaloni, R., Giugliano, D., Esposito, K., . . . Ceriello, A. Intermittent high glucose enhances icam-1, vcam-1, e-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: The role of poly(adp-ribose) polymerase. *J Thromb Haemost.* 2004; 2 (8): 1453-1459.
- Piga, R., Naito, Y., Kokura, S., Handa, O., & Yoshikawa, T. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing vcam-1 and mcp-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2007; 193 (2): 328-334.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11).
- Polettini, J., Behnia, F., Taylor, B. D., Saade, G. R., Taylor, R. N., & Menon, R. Telomere fragment induced amnion cell senescence: A contributor to parturition? *PLoS One.* 2015; 10 (9): e0137188.
- Pyo, J. O., Nah, J., & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med.* 2012; 44 (2): 73-80.
- Qian, X., Li, X., Cai, Q., Zhang, C., Yu, Q., Jiang, Y., . . . Lu, Z. Phosphoglycerate kinase 1 phosphorylates beclin1 to induce autophagy. *Mol Cell.* 2017; 65 (5): 917-931 e916.
- Recchioni, R., Marcheselli, F., Moroni, F., & Pieri, C. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by n-acetyl-l-cysteine. *Metabolism.* 2002; 51 (11): 1384-1388.
- Redman, C. W., & Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308 (5728): 1592-1594.
- Roach, P. J. Ampk -> ulk1 -> autophagy. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (15): 3082-3084.
- Rubinshtein, D. C., Shpilka, T., & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol.* 2012; 22 (1): R29-34.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., . . . Guan, K. L. Ulk1 induces autophagy by phosphorylating beclin-1 and activating vps34 lipid kinase. *Nat Cell Biol.* 2013; 15 (7): 741-750.
- Sandoo, A., van Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4: 302-312.
- Sangle, G. V., Chowdhury, S. K., Xie, X., Stelmack, G. L., Halayko, A. J., & Shen, G. X. Impairment of mitochondrial respiratory chain activity in aortic endothelial cells induced by glycated low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48 (6): 781-790.
- Santana-Codina, N., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. The role of autophagy in cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017; 1: 19-39.
- Schaaf, M. B., Houbaert, D., Mece, O., & Agostinis, P. Autophagy in endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cell Death Differ.* 2019; 26 (4): 665-679.
- Schlafke, S., & Enders, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod.* 1975; 12 (1): 41-65.

- Schmidt, A. M., Hori, O., Chen, J. X., Li, J. F., Crandall, J., Zhang, J., . . . Stern, D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (vcam-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.* 1995; 96 (3): 1395-1403.
- Scott, R. C., Juhasz, G., & Neufeld, T. P. Direct induction of autophagy by atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol.* 2007; 17 (1): 1-11.
- Sell, D. R., & Monnier, V. M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989; 264 (36): 21597-21602.
- Shin, J. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Arch Pharm Res.* 1998; 21 (6): 629-633.
- Signorelli, P., Avagliano, L., Virgili, E., Gagliostro, V., Doi, P., Braidotti, P., . . . Marconi, A. M. Autophagy in term normal human placentas. *Placenta.* 2011; 32 (6): 482-485.
- Silverman, B. L., Rizzo, T., Green, O. C., Cho, N. H., Winter, R. J., Ogata, E. S., . . . Metzger, B. E. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes.* 1991; 40 Suppl 2: 121-125.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia.* 2001; 44 (2): 129-146.
- Singh, R., & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 2011; 13 (5): 495-504.
- Slavina, E. S., Madanat, A., Pankov Yu, A., Syrkin, A. L., Tertov, V. V., & Orekhov, A. N. Diabetes mellitus and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1987; 317 (13): 836.
- Song, X., Zhu, S., Chen, P., Hou, W., Wen, Q., Liu, J., . . . Tang, D. Ampk-mediated becn1 phosphorylation promotes ferroptosis by directly blocking system xc(-) activity. *Curr Biol.* 2018; 28 (15): 2388-2399 e2385.
- Sridhar, S., Botbol, Y., Macian, F., & Cuervo, A. M. Autophagy and disease: Always two sides to a problem. *J Pathol.* 2012; 226 (2): 255-273.
- Stinghen, A. E., Massy, Z. A., Vlassara, H., Striker, G. E., & Boullier, A. Uremic toxicity of advanced glycation end products in ckd. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27 (2): 354-370.
- Su, H., & Wang, X. Autophagy and p62 in cardiac protein quality control. *Autophagy.* 2011; 7 (11): 1382-1383.
- Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008; 22 (12): 1577-1590.
- Tabit, C. E., Chung, W. B., Hamburg, N. M., & Vita, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11 (1): 61-74.
- Tanaka, H., Dinunno, F. A., Monahan, K. D., Clevenger, C. M., DeSouza, C. A., & Seals, D. R. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation.* 2000; 102 (11): 1270-1275.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C. W., Farkas, A., Loughran, P., . . . Lotze, M. T. Endogenous hmgb1 regulates autophagy. *J Cell Biol.* 2010; 190 (5): 881-892.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M., & Lin, A. Inhibition of jnk activation through nf-kappab target genes. *Nature.* 2001; 414 (6861): 313-317.
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous lc3 is a marker for autophagy. *Autophagy.* 2005; 1 (2): 84-91.
- Tassa, A., Roux, M. P., Attaix, D., & Bechet, D. M. Class iii phosphoinositide 3-kinase--beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in c2c12 myotubes. *Biochem J.* 2003; 376 (Pt 3): 577-586.

- Thoresen, S. B., Pedersen, N. M., Liestol, K., & Stenmark, H. A phosphatidylinositol 3-kinase class iii sub-complex containing vps15, vps34, beclin 1, uvrag and bif-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Exp Cell Res.* 2010; 316 (20): 3368-3378.
- Thornalley, P. J. The glyoxalase system: New developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* 1990; 269 (1): 1-11.
- Tian, D., Xiang, Y., Tang, Y., Ge, Z., Li, Q., & Zhang, Y. Circ-adam9 targeting pten and atg7 promotes autophagy and apoptosis of diabetic endothelial progenitor cells by sponging mir-20a-5p. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (7): 526.
- Tian, Z., Wang, C., Hu, C., Tian, Y., Liu, J., & Wang, X. Autophagic-lysosomal inhibition compromises ubiquitin-proteasome system performance in a p62 dependent manner in cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e100715.
- Toma, L., Stancu, C. S., Botez, G. M., Sima, A. V., & Simionescu, M. Irreversibly glycated ldl induce oxidative and inflammatory state in human endothelial cells; added effect of high glucose. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390 (3): 877-882.
- Tsao, P. S., Niebauer, J., Buitrago, R., Lin, P. S., Wang, B. Y., Cooke, J. P., . . . Reaven, G. M. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (6): 947-953.
- Tsuneki, H., Sekizaki, N., Suzuki, T., Kobayashi, S., Wada, T., Okamoto, T., . . . Sasaoka, T. Coenzyme q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2007; 566 (1-3): 1-10.
- Turco, M. Y., & Moffett, A. Development of the human placenta. *Development.* 2019; 146 (22).
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., . . . Shirihai, O. S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008; 27 (2): 433-446.
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777 (9): 1092-1097.
- Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (11): 692-704.
- Vion, A. C., Kheloufi, M., Hammoutene, A., Poisson, J., Lasselin, J., Devue, C., . . . Rautou, P. E. Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114 (41): E8675-E8684.
- Walter Boron, E. B. (2016). Fertilization, pregnancy and lactation. In *Medical physiology 3rd edition* (pp. 1177): Elsevier.
- Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, D. S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., . . . Yue, Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci.* 2006; 26 (31): 8057-8068.
- Wells-Knecht, K. J., Zyzak, D. V., Litchfield, J. E., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry.* 1995; 34 (11): 3702-3709.
- Wells-Knecht, M. C., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry.* 1995; 34 (46): 15134-15141.
- Wesselborg, S., & Stork, B. Autophagy signal transduction by atg proteins: From hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72 (24): 4721-4757.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. Idf diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 94 (3): 311-321.
- Wild, P., McEwan, D. G., & Dikic, I. The lc3 interactome at a glance. *J Cell Sci.* 2014; 127 (Pt 1): 3-9.
- Wolff, S. P., Jiang, Z. Y., & Hunt, J. V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10 (5): 339-352.

- Wu, Y. T., Tan, H. L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M. R., . . . Shen, H. M. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class i and iii phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2010; 285 (14): 10850-10861.
- Xie, J., Cui, K., Hao, H., Zhang, Y., Lin, H., Chen, Z., . . . Liao, Y. Acute hyperglycemia suppresses left ventricular diastolic function and inhibits autophagic flux in mice under prohypertrophic stimulation. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15 (1): 136.
- Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J., & Ferro, A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.* 2003; 17 (10): 1289-1291.
- Xu, B., Ji, Y., Yao, K., Cao, Y. X., & Ferro, A. Inhibition of human endothelial cell nitric oxide synthesis by advanced glycation end-products but not glucose: Relevance to diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2005; 109 (5): 439-446.
- Xu, Y. X., Huang, C., Liu, M., Chen, N., Chen, W., Yang, C., . . . Yang, S. Survivin regulated by autophagy mediates hyperglycemia-induced vascular endothelial cell dysfunction. *Exp Cell Res.* 2018; 364 (2): 152-159.
- Yamawaki, H., Saito, K., Okada, M., & Hara, Y. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via jnk and p38 in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295 (6): C1510-1517.
- Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., . . . Stern, D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994; 269 (13): 9889-9897.
- Yang, X. Q., Wang, Y. Y., & Chen, A. F. Increased superoxide contributes to enhancement of vascular contraction in ins2(akita) diabetic mice, an autosomal dominant mutant model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35 (9): 1097-1103.
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. Autophagy: Machinery and regulation. *Microb Cell.* 2016; 3 (12): 588-596.
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. Monitoring and measuring autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (9).
- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103 (8): 2653-2658.
- Yu, T., Sheu, S. S., Robotham, J. L., & Yoon, Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 2008; 79 (2): 341-351.
- Yu, Y., Jenkins, A. J., Nankervis, A. J., Hanssen, K. F., Scholz, H., Henriksen, T., . . . Lyons, T. J. Anti-angiogenic factors and pre-eclampsia in type 1 diabetic women. *Diabetologia.* 2009; 52 (1): 160-168.
- Yuan, W., Stromhaug, P. E., & Dunn, W. A., Jr. Glucose-induced autophagy of peroxisomes in *pichia pastoris* requires a unique e1-like protein. *Mol Biol Cell.* 1999; 10 (5): 1353-1366.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., . . . Denk, H. P62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol.* 2002; 160 (1): 255-263.
- Zhang, P. W., Tian, C., Xu, F. Y., Chen, Z., Burnside, R., Yi, W. J., . . . Ying, C. J. Green tea polyphenols alleviate autophagy inhibition induced by high glucose in endothelial cells. *Biomed Environ Sci.* 2016; 29 (7): 524-528.
- Zhu, W., Yuan, Y., Liao, G., Li, L., Liu, J., Chen, Y., . . . Lu, Y. Mesenchymal stem cells ameliorate hyperglycemia-induced endothelial injury through modulation of mitophagy. *Cell Death Dis.* 2018; 9 (8): 837.
- Zorzano, A., Liesa, M., & Palacin, M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41 (10): 1846-1854.

Zou, M. H., Shi, C., & Cohen, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002; 109 (6): 817-826.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kerem	Uyruğu	Türk
Soyadı	YANAR	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Bolu Fen Lisesi	2012
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi	2017
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	72

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

Poster sunumu, 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 24-26 Nisan 2019.
“YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ SONUCU GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN
PLASENTALARINDA ANJİYOGENEZ MEKANİZMASININ İNCELENMESİ”

“Does Fresh or Frozen Embryo Transfer Affect Imprinted Gene Expressions in Human Term Placenta?”, **Acta Histochem**, **123 (3)**, 151694. Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., Isenlik, B. S., Erman, M., Sakinci, M., Berkkanoglu, M., Coetzee, K., Ozgur, K., Cetindag, E., Yanar, K., Korgun, E. T. **2021**.

“Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon Fonksiyonları”, **Akdeniz Medical Journal**. Cebeci, E., Yanik, T., Çetindağ, E., Yanar, K., Korkmaz, G., Korgun, E. **2020**.

“Contribution of Human Trophoblast Progenitor Cells to Neurogenesis in Rat Focal Cerebral Ischemia Model”, **Brain Inj**, **1-13**. Yanar, K., Molbay, M., Özaydın-Goksu, E., Unek, G., Cetindağ, E., Unal, A., Korgun, E. T. **2021**.

“Expression of Glucose Transporters in the Human Amnion Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Normoglycemic and Hyperglycemic Conditions”, **Biologia** **75**, 299–308. Unek, G., Cetinkaya, B., Dogru, S., Dogum, K., Molbay, M., Ozmen, A., Yanar, K., Kipmen-Korgun, D., Koksoy, S., Sakinci, M., Korgun, E. T. **2020**.